



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NUCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE - PGDRA

CARACTERIZAÇÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE
GAMETOFÍTICA DE CLONES SUPERIORES DE *Coffea canephora*

TATIANE ALMEIDA LOPES

PORTO VELHO - RO
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA - UNIR
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NUCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E
MEIO AMBIENTE - PGDRA

CARACTERIZAÇÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE
GAMETOFÍTICA DE CLONES SUPERIORES DE *Coffea canephora*

TATIANE ALMEIDA LOPES

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha.

Dissertação apresentada como requisito avaliativo do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente - PGDRA da Universidade Federal de Rondônia - UNIR, Área de concentração Desenvolvimento Sustentável e Diagnóstico Ambiental, Linha de Pesquisa 1 Ambiente, Saúde & Sustentabilidade, para a obtenção do Título de Mestre.

PORTO VELHO - RO
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

L863c

Lopes, Tatiane Almeida

Caracterização da autoincompatibilidade gametofítica de clones superiores de *Coffea Canephora*./Tatiane Almeida Lopes. Porto Velho, Rondônia, 2015.
64 f.

Orientador: Dr. Rodrigo Barros Rocha

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional) - Universidade Federal de Rondônia, Núcleo de Ciências Exatas e da Terra.


1. Melhoramento de plantas. 2. Seleção. 3. Autoincompatibilidade gametofítica. I. Rocha, Rodrigo Barros. II. Título.

CDU: 332.146.2

TATIANE ALMEIDA LOPES

**"CARACTERIZAÇÃO DA AUTOINCOMPATIBILIDADE GAMETOFÍTICA
DE CLONES SUPERIORES DE *Coffea canephora*".**

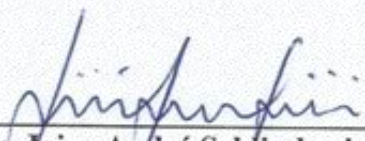
Comissão Examinadora



Dr. Rodrigo Barros Rocha

Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dr. Jairo André Schlindwein

Membro

Fundação Universidade Federal de Rondônia



Dr. Alexsandro Lara Teixeira

Membro Externo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Dr. Artur de Souza Moret
Suplente

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 29 de Outubro de 2015.

Resultado: Aprovada

Dedico ao meu avô Marcionílio Lunier do Couto (*in memoriam*) que desempenhou brilhantemente o papel de pai, deixando muita saudade, e sempre será lembrado por mim com muito amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus minha vitória, pois com ajuda Dele superei todas as dificuldades. Mandou-me pessoas que deram força nessa trajetória para ajudar a tirar as pedras em meu caminho.

Família como base de tudo, sempre com orgulho por estar almejando mais um nível em minha vida profissional, em especial ao meu "Pai-avô", Marcionílio Lunier (*in memorian*), que dias antes de partir me parabenizou com um cansado e singelo sorriso pela minha aprovação na seleção, minha mãe-avó Lourdes Almeida pela paciência nos meus momentos de estresse com milhões de artigos e dissertação para ler e desenvolver, por ficar preocupada por eu passar madrugadas e madrugadas nesses dois anos de caminhada estudando e por fim a mais nova integrante da família, minha linda sobrinha Lohana de Almeida Vieira Belarmino.

Ao meu namorado, dedicado e atencioso, Marcelo Valjean Lemos de Almeida, por passar feriados e finais de semana me ouvindo falar sobre artigos, dissertação, *Coffea canephora* e nos momentos finais me acompanhar nas madrugadas de estudo e assistir meus ensaios para defesa inúmeras vezes, sem cansar ou reclamar. Minha imensa gratidão!

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente (PGDRA), em especial à secretária Izabel Tavares por sempre responder aos meus e-mails e estar sempre prontificada a me ajudar nos documentos ou nas informações pertinentes ao meu mestrado, sempre com simpatia, educação e eficiência, minha sincera admiração e ao Professor Doutor Artur Moret, coordenador do curso e professor, pela preocupação com minha data de qualificação e por ser um brilhante professor exigente e que é fonte de inspiração por sua dedicação e empenho em tudo que faz.

Aos amigos da turma do PGDRA 2013 da Universidade Federal de Rondônia e da Embrapa Rondônia, que também foram fundamentais em minha trajetória, como amigos de turma, em especial, Juliana Pinheiro e Carolina Rodrigues, além de amigas também ganhei irmãs; Pollyana Araújo, Milene de Castro e Wanessa de Oliveira que foram amigas que me aproximei muito nesse período. Aos funcionários da Embrapa Rondônia, Anselmo Ricardo, José Roberto Vieira, Domingos Sávio (técnico do laboratório de Fitopatologia), Abadio Hermes, Ademar Bastos, Ana Karina e estagiários Beatriz Ferreira, Daiane Maia, Simone Sangi, Tamiris Chaves, Sara Inácia e Fabrício Pereira. Amigos que me orgulho em dizer que

me fizeram superar tristezas, que me tiraram sorrisos em dias cansativos, seja nos dias inteiros de aulas na UNIR ou no laboratório de Fitopatologia da Embrapa-RO, todos tem um lugar especial em meu coração.

Agradeço também aos amigos de trabalho recentes, pela força e incentivo, em especial aos meus chefes Luciano Walério, Kenny Obiorana e Onguido Moraes, por me ajudarem com muita compreensão ao permitirem minhas ausências da empresa CAERD.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À banca examinadora da qualificação Prof. Dr. Alexsandro Lara Teixeira e Prof. Dr. Jairo André Schlindwein, pelos conselhos, sugestões e ensinamentos prestados, que acabaram por constituir essa dissertação.

Ao meu grande orientador professor Doutor Rodrigo Barros Rocha, peça chave nessa minha vitória, sem palavras para descrever a importância dele em minha trajetória. Uma paciência sem tamanho e uma dedicação incrível. Sei que pela convivência, tornei-me uma pessoa melhor, pelos conselhos, ajudas e ensinamentos. Não sabe o imenso orgulho que tive em ser sua orientanda. Professor dedicado, cuidadoso com as palavras, compreensivo, pois em um momento grave de saúde que tive esse ano de 2015, ele soube me trazer calma com o imenso trabalho que ainda teria que resolver. Um espelho como ser humano e como profissional. Professor indescritível. Não poderia ter tido um orientador melhor. A ele dedico toda minha admiração e gratidão.

A todos que contribuíram direta e indiretamente, pela elaboração desta dissertação e torceram pela minha vitória, o meu muito obrigada!

Resumo

A capacidade de se evitar a autofecundação é uma característica que evoluiu como uma forma de evitar os efeitos deletérios da endogamia em várias espécies vegetais alógamas, incluindo o *Coffea canephora*. O objetivo deste trabalho foi realizar hibridações direcionadas para identificar plantas testadoras da autoincompatibilidade do *Coffea canephora* e caracterizar uma população de melhoramento a partir da visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos durante a polinização. As hibridações foram realizadas em delineamento de dialelo parcial sem cruzamentos recíprocos para caracterização da genealogia do gene S, que governa a expressão dessa característica. Para verificar a probabilidade de ocorrência da genealogia obtida em função da hipótese H_0 de que todos os genótipos fazem parte do mesmo grupo de compatibilidade foi utilizado o teste da razão de verossimilhança. Observou-se que a genealogia obtida foi 10^9 vezes mais provável do que a hipótese H_0 , e que os genótipos 194, 125, 160, 130, 199 se agruparam em três grupos de compatibilidade. A partir desses resultados os clones 194, 125 e 160 foram selecionados como plantas testadoras para inferir a compatibilidade de uma população segregante. Além dos grupos de compatibilidade I, II e III, observados nas frequências de 0,38, 0,25 e 0,19, também foram encontradas plantas compatíveis com os três testadores (0,18) indicando a existência de pelo menos mais um grupo de compatibilidade. A existência de outros grupos de compatibilidade indica a ocorrência de pelo menos mais uma forma alélica do gene S, diferindo das informações da literatura que sugerem a segregação de apenas três formas alélicas em germoplasma brasileiro. Diferente das avaliações realizadas no centro de origem, as frequências observadas não estão em Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) a 5% de probabilidade, indicando que a população avaliada nesse estudo não apresenta a variabilidade alélica do gene S no centro de origem dessa espécie.

Palavras-chave: Melhoramento de plantas, seleção, autoincompatibilidade gametofítica.

Abstract

The ability to avoid self-pollination is a trait that has evolved as a manner of averting the deleterious effects of inbreeding in various allogamous plant species, including *Coffea canephora*. The objective of this study was to carry out hybridizations to identify tester plants of *Coffea canephora* autoincompatibility and characterize a breeding population, since the plant selection may reduce the variability of this trait. Hybridizations were carried out in a partial diallel design in a greenhouse and in the field. The likelihood ratio test was used to control the occurrence of the type I error (which occurs when the hypothesis H_0 , that the individuals are part of the same compatibility group, is erroneously rejected) and of the type II error (which occurs when incompatible plants produce fruits due to contamination in the procedure). Based in the genealogy the clones 194, 125 and 160 were selected as testers plants to infer the compatibility of a segregating population. Besides the compatibility groups I, II and III, observed in the frequencies of 38%, 25% and 19% respectively, were found genotypes compatible to the three testers (18%), indicating the existence of at least one more compatibility group. The existence of others compatibility groups indicates the occurrence of, at least, one more allelic form, differing from the scientific literature that suggests the segregation of only three allelic forms in Brazilian germplasm. Unlike evaluations conducted in the center of origin, the observed frequencies differ from the expected proportions for a population in Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) a 5% probability, indicating that the segregating population does not present the genetic variability of the S gene in the center of origin of this specie.

Keywords: Plant breeding, selection, gametophytic self-incompatibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura básica da flor do café adaptado de Charrier e Eskes (2004).....19
- Figura 2.** Detalhe da lavoura de café clonal no município de Rolim de Moura, plantados em linha, em que um clone não floresceu no mesmo dia dos demais, portanto havendo falha na sincronia da polinização. Foto: Frederico José Evangelista Botelho.....27
- Figura 3.** Imagens utilizando microscopia de fluorescência em aumento de 20 vezes (A) e 40 vezes (B) da estrutura dos grãos de pólen e dos tubos polínicos no estigma da flor 30 horas após a polinização. Figura adaptada de Nowak et al.,2011.....30
- Figura 4.** Imagens do desenvolvimento dos tubos polínicos 30 horas após a hibridação direcionada entre os clones 194 e 125 utilizando microscopia de fluorescência em aumento de 10 vezes (A) e 20 vezes (B). Foto: Tatiane Almeida Lopes.....33
- Figura 5.** Indução do florescimento realizado em casa de vegetação: **A e B:** Plantas mostrando sinais de déficit hídrico, **C e D:** Quebra de dormência dos botões florais com a irrigação das plantas após período de déficit hídrico, **E:** Desenvolvimento das flores e antese, **F:** antese no momento da hibridação.....42
- Figura 6.** Registro fotográfico da hibridação direcionada e desenvolvimento dos frutos em casa de vegetação: **A e B:** Ramos plagiotrópicos protegidos, **C:** Antese no dia da hibridação, **D, E e F:** Cruzamento compatível frutos em desenvolvimento (fase de chumbinho).....44
- Figura 7.** Desenvolvimento dos frutos da hibridação compatível realizada entre os clones 160 e 125 e de hibridação não compatível realizada entre os clones 160 e 130. A ocorrência de frutos nos cruzamentos não compatíveis deve-se a novos florescimentos ocorridos após a hibridação.....45
- Figura 8.** **A e B:** Estilos sem a presença de tubos polínicos desenvolvidos nos estigmas das flores receptoras avaliadas do cruzamento dos entre os clones 130 x 160. (cruzamentos não compatíveis). **C e D:** Estilos com a presença de tubos polínicos desenvolvidos nos estigmas das flores receptoras avaliadas do cruzamento entre os clones 125 x 199. (cruzamentos compatíveis). Foto: Tatiane Almeida Lopes.....47

| | |
|---|----|
| Figura 9. Número de maneiras possíveis com que n indivíduos ($1 \leq n \leq 20$) podem ser organizar em j grupos de compatibilidade ($3 \leq j \leq 6$)..... | 50 |
| Figura 10. A. Resultados das hibridações direcionadas realizadas entre cinco clones de <i>Coffea canephora</i> , em que: C – cruzamento compatível, NC – cruzamento não compatível. B. Esquema mais provável de distribuição dos genótipos em seus respectivos grupos de compatibilidade indicados pelos algarismos romanos I, II e III..... | 51 |
| Figura 11. Detalhes das estruturas do tubo polínico no estigma da flor no aumento de 10 vezes (A) e de 20 vezes (B), destacando a ocorrência de caloses e sua disposição no estigma da planta..... | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número possível de combinações que podem ser obtidas na avaliação de n clones em g grupos de compatibilidade..... | 35 |
| Tabela 2. Relação entre o número de grupos de compatibilidade que podem ser obtidos a Partir de diferentes número de alelos do gene S..... | 36 |
| Tabela 3. Descendência esperada do cruzamento entre os genitores compatíveis, considerando três formas alélicas ao gene S em população de <i>Coffea canephora</i> | 37 |
| Tabela 4. Esquema em dialelo parcial sem genitores e sem recíprocos das hibridações direcionadas realizadas entre clones superiores de <i>Coffea canephora</i> . Embrapa Rondônia - Porto Velho 2014..... | 40 |
| Tabela 5. Distribuição dos acessos caracterizados de acordo em grupos de compatibilidade determinados pela visualização <i>in vitro</i> do desenvolvimento do tubo polínico. Os grupos de compatibilidade estão representados por algarismos romanos do I ao III..... | 55 |
| Tabela 6. Número de grupos de compatibilidades que podem ser formados a partir de n formas alélicas do gene S..... | 56 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1 - OBJETIVOS..... | 16 |
| 1.1 - Geral..... | 16 |
| 1.2 - Específicos..... | 16 |
| 2 - REFERENCIAL TEÓRICO..... | 17 |
| 2.1 - Aspectos Botânicos de <i>Coffea canephora</i> | 17 |
| 2.2 - Botânica Floral e Polinização do Cafeeiro <i>Coffea canephora</i> | 18 |
| 2.3 - Autoincompatibilidade em Plantas (AI) | 21 |
| 2.3.1 - Autoincompatibilidade Esporofítica (AIE)..... | 23 |
| 2.3.2 - Autoincompatibilidade Gametofítica (AIG)..... | 24 |
| 2.4 - Autoincompatibilidade em <i>Coffea canephora</i> Pierre | 25 |
| 2.5 - Autoincompatibilidade e Melhoramento..... | 28 |
| 2.6 - Microscopia de Fluorescência..... | 29 |
| 2.7 - Frequências alélicas, Genotípicas e Equilíbrio de Hardy Weinberg..... | 31 |
| 2.8 - Estimativa de Máxima Verossimilhança..... | 38 |
| 3 - MATERIAIS E MÉTODOS..... | 40 |
| 3.1 - Híbridações direcionadas e seleção de plantas testadoras..... | 40 |
| 3.2 - Avaliação <i>in vitro</i> da compatibilidade..... | 46 |
| 3.3 - Interpretação de dados..... | 48 |
| 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 50 |
| CONCLUSÕES..... | 58 |
| REFERÊNCIAS..... | 59 |

INTRODUÇÃO

A espécie *Coffea canephora* Pierre ex Froehner possui ampla distribuição geográfica, com ocorrência em diversos continentes, se expandido por uma faixa tropical que engloba as regiões mais quentes do planeta (BERTHAUD e CHARRIER, 1988). De acordo com a “International Coffee Organization” (ICO), em 2013 o Brasil foi o maior exportador de café, tendo produzido uma safra recorde de 49,2 milhões de sacas. Aproximadamente 30% da produção de café do mundo deve-se ao cultivo dessa espécie que se caracteriza pelo elevado vigor vegetativo e produção de uma bebida neutra com alto teor de sólidos solúveis (PORTO et al., 2013).

A capacidade de se evitar a autofecundação é uma importante característica do sistema reprodutivo de várias espécies vegetais alógamas, incluindo o *Coffea canephora*, e que evoluiu como uma forma de evitar os efeitos deletérios da endogamia (CASTRIC e VEKEMANS, 2004). A autoincompatibilidade (AI) é um mecanismo fisiológico que impede uma planta fértil de formar sementes viáveis quando fertilizada por seu próprio pólen (SCHIFINO-WITTMANN e DALL’AGNOL, 2002). No cafeeiro Conilon, esse impedimento à autofecundação deve-se, a paralisação do desenvolvimento dos tubos polínicos, que impossibilita a fertilização do gametófito feminino (BERTHAUD, 1980).

O *Coffea canephora* apresenta autoincompatibilidade gametofítica e a reação de incompatibilidade ocorre entre o tubo polínico e o grão de pólen, que não deve compartilhar o mesmo alelo da planta receptora (LASHERMES et al., 1996; NOWAK et al., 2011). Nesta espécie, a autoincompatibilidade tem sua expressão governada por apenas um gene multialélico identificado pela letra S (BERTHAUD, 1980). A paralisação no crescimento do tubo polínico deve-se a ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico impedindo o crescimento do tubo polínico (CASTRIC e VEKEMANS, 2004).

Na cafeicultura clonal, o plantio de clones não compatíveis pode comprometer a produtividade e a qualidade dos grãos devido a menor eficiência da polinização e aumento na taxa de grãos do tipo moca (FERRO et al., 2007). Embora avaliações no centro de origem indiquem a existência de até cinco formas alélicas do gene S (OMOLAJA e FAWOLE, 2004), observações de campo indicam a ocorrência de apenas três formas alélicas na expressão desta característica em germoplasma brasileiro (S₁, S₂ e S₃) (CONAGIN e MENDES, 1961; FERRÃO et al., 2007a). Estudos mais recentes mostraram que no *Coffea canephora* a incompatibilidade deve-se a ação de glicoproteínas específicas expressas no estigma da flor e

nos grãos de pólen que interagem quando idênticas formando dímeros que sinalizam a paralisação do crescimento dos tubos polínicos (FRANKLIN-TONG e FRANKLIN, 2003; NOWAK et al., 2011).

Apesar da incompatibilidade do *Coffea canephora* ter sido relatada ainda na década de 60, poucos trabalhos se dedicaram a caracterizar a compatibilidade do *Coffea canephora* dessa espécie, entre os quais destacam-se os mais importantes: Devreux et al. (1959) observaram que após a autopolinização, o tubo polínico não se desenvolve não permitindo que o grão de pólen chegue até o ovário. Conagin and Mendes (1961) e Berthaud (1980) levantaram evidências de que a autoincompatibilidade em *Coffea canephora* deve ser governada pela ação de um único gene S, com três formas alélicas (S₁, S₂, S₃). Mais recentemente no centro de origem e de diversificação desta espécie, Omolaja e Fawole (2004) quantificaram a interação de cinco formas alélicas na expressão desta característica. Lashermes et al., 1996 identificaram um marcador molecular associado a essa característica pelo desenvolvimento de populações duplo-haploídes, homozigotas para o gene S. De Franceschi et al. (2012) descreveram que a incompatibilidade deve-se a interação de glicoproteínas específicas no estigma da flor e nos grãos de pólen que se combinam para formação de dímeros. Nowak et al. (2011) caracterizaram o polimorfismo deste gene entre várias espécies do gênero *Coffea*.

O objetivo deste trabalho foi realizar hibridações direcionadas para identificar plantas testadoras da autoincompatibilidade gametofítica de *Coffea canephora* e caracterizar uma população de melhoramento a partir da visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos durante a polinização.

1-OBJETIVOS

1.1 - GERAL

Avaliar a resposta de autocompatibilidade gametofítica de clones de *Coffea canephora* em campo e em laboratório, considerando a caracterização genotípica de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade e de população de melhoramento segregante para essa característica.

1.2 – ESPECÍFICOS

1. Realizar hibridações direcionadas em casa de vegetação utilizando condições controladas;
2. Caracterizar geneticamente clones testadores dos três ou mais grupos de compatibilidade do cafeeiro Conilon;
3. Avaliar a genealogia do gene S identificando o número de formas alélicas e o número de grupos de compatibilidade;
4. Implementar metodologia *in vitro* para caracterização da autoincompatibilidade;
5. Caracterizar uma população de melhoramento segregante para essa característica.

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Coffea canephora*

A América do Sul apresenta condições climáticas favoráveis para o cultivo do café, sendo o Brasil um dos maiores produtores com uma participação de 32,16%, da produção mundial (ABIC, 2015). A exportação brasileira de café na safra 2014/15 (julho de 2014 a junho de 2015) registrou recorde histórico de 36,49 milhões de sacas de 60 kg (CONAB, 2015). Na Amazônia Ocidental o Estado de Rondônia destaca-se pela sua aptidão para cultivo do *Coffea canephora* em regime de agricultura familiar, com cafezais pequenos de até 10 hectares (MARCOLAN et al., 2009). Em função da sua menor acidez e maior quantidade de sólidos solúveis, o *Coffea canephora* é utilizado pela indústria na fabricação dos cafés solúveis e em misturas com o café arábica (*Coffea arabica*) (FERRÃO et al., 2007a).

O gênero *Coffea* da família Rubiaceae possui mais de 100 espécies de ocorrência natural em regiões de clima tropical (BRIDSON, 1994). Sendo que deste universo apenas as espécies *Coffea canephora* e *C. arabica* são cultivadas em escala comercial. Entre as espécies cultivadas regionalmente, estão o *Coffea liberica* e o *Coffea excelsa*, cultivadas no oeste da África e Ásia (FAZUOLI et al., 1994).

As plantas do gênero *Coffea* se caracterizam por apresentar: arquitetura formada por apenas um ou múltiplos ramos verticais (ortotrópicos) que se ramificam em múltiplos ramos secundários horizontais (plagiotrópicos); folhas simples e opostas; flores de corola branca que produzem grandes quantidades de néctar; inflorescências que produzem de 3 a 20 flores, ocasionalmente apenas uma; ovário com dois carpelos e frutos com uma polpa adocicada que contém duas amêndoas com uma cicatriz longitudinal (CHARRIER e ESKES, 2004).

Em relação às principais características morfológicas que diferenciam o *Coffea canephora* do *C. Arabica* destacam-se o crescimento arbustivo e multicaule, o maior vigor, as folhas maiores de coloração menos intensa, os frutos menores, esféricos e de exocarpo mais fino, as sementes de película prateada com maior conteúdo de cafeína (FERRÃO et al., 2007b).

Diferenças no sistema reprodutivo dessas espécies tem grandes implicações para o melhoramento genético. O *Coffea arabica* é uma espécie alotetraplóide, autógama com $2n=4x=44$ cromossomos, sendo capaz de se autopolinizar naturalmente em campo. Estudos filogenéticos têm levantado evidências de que o *C. arabica* se originou da hibridação de gametas não reduzidos de *C. eugenoides* e *Coffea canephora* (SAKIYAMA et al., 1999).

Por sua vez o *Coffea canephora* é uma espécie alógama, diploide ($2n=2x=22$ cromossomos), incapaz de se autofecundar naturalmente por apresentar mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica. Esse sistema reprodutivo contribui para a manutenção da diversidade genética dessa espécie, uma vez que favorece a formação natural de populações heterozigotas, com maior probabilidade de expressar o vigor característico dos indivíduos híbridos e menor probabilidade de expressar os efeitos deletérios da endogamia (BORÉM e MIRANDA, 2013).

A identificação de grupos botânicos distintos, estabelecidos em função da sua origem geográfica e divergência genética, subsidiaram em 1985 na Costa do Marfim a implantação de um dos primeiros programas de melhoramento de *Coffea canephora* utilizando seleção recorrente recíproca (BERTHAUD, 1985). No grupo Congolense originário da África Central (República Centro Africana, Congo e Camarões), está o café denominado de Robusta que se caracteriza pelo maior porte, crescimento ereto, folhas e frutos de maior tamanho, maturação tardia e maior resistência a nematoides e a ferrugem. Baseado em sua diversidade genética Montagnon et al. (1992) sugeriram a separação das plantas desse grupo em dois subgrupos (SG1 e SG2).

No grupo denominado de Guineano, originado do oeste da África (Guiné e Costa do Marfim), está o café “Kouillou”, chamado no Brasil de Conilon, que se caracteriza por apresentar crescimento arbustivo, folhas alongadas, maior tolerância ao déficit hídrico e maior suscetibilidade a doenças. Visando identificar novas fontes de resistência a *Hemileia vastatrix* Berk et, estudos de caracterização das variedades botânicas iniciaram-se somente a partir da década de 90 e tendo em vista o longo ciclo dessa espécie, ainda podem ser considerados recentes (FERRÃO et al., 2007a).

2.2 - BOTÂNICA FLORAL E POLINIZAÇÃO DO CAFEIEIRO *Coffea canephora*

O *Coffea canephora* é uma angiosperma, dicotiledônea e autoincompatível que para se reproduzir necessita que ocorra a fecundação cruzada, uma vez que nessa espécie, a união entre os gametas masculinos e femininos ocorre somente se estes foram produzidos por plantas diferentes (BERTHAUD, 1980). Nesse processo, as flores do cafeeiro são fundamentais para assegurar a reprodução da espécie e a produção dos frutos, uma vez que contém suas estruturas reprodutivas.

Em relação às suas partes mais importantes, ovário, sépalas, pétalas, estames e pistilo, a flor do café se caracteriza por apresentar cinco pétalas brancas fundidas na corola que formam um cálice aderido sobre o ovário, denominado por esse motivo, de ovário ínfero

(Figura 1). Os grãos de pólen são produzidos em duas anteras sustentadas por filetes, estruturas finas e delgadas que sustentam os estames próximos ao estigma da flor. O estigma bifido se localiza sobre um prolongamento na forma de um tubo fino, denominado de estilo ou estilete. O tecido do estilete está ligado às cavidades do ovário através do tecido estigmatóide, também chamado de tecido de transmissão, que apresenta dois canais independentes. O conjunto estigma, estilete e ovário também pode ser chamado de pistilo (ALLARD, 1971).

O ovário bilocular possui duas cavidades separadas que abrigam separadamente dois óvulos. Essas cavidades se comunicam com o estilete por canais diferentes podendo ocorrer à polinização dos dois óvulos, de apenas um ou até mesmo de nenhum, sendo a fertilização dependente do transporte, germinação dos grãos de pólen e do desenvolvimento dos seus tubos polínicos de grãos de pólen compatíveis no estigma da flor.

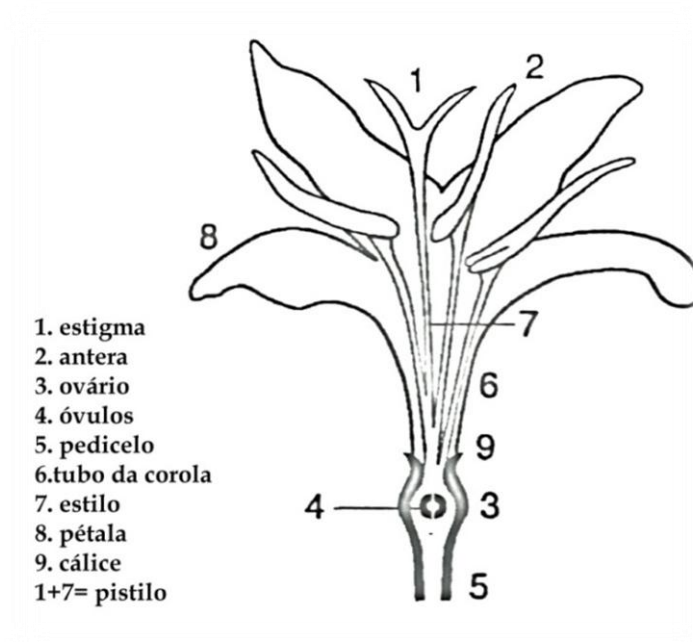


Figura 1. Estrutura básica da flor do café adaptado de Charrier e Eskes (2004).

Frutos desenvolvidos a partir da fertilização dos dois óvulos, localizados nas cavidades do ovário bilocular, dão origem a grãos com a superfície dorsal convexa e a ventral plana com uma ranhura central no sentido longitudinal, chamados de grãos do tipo “chato”. O desenvolvimento de frutos em que apenas um óvulo foi fertilizado produz grãos que

apresentam uma ranhura central no sentido longitudinal e um formato ovóide, denominados de grãos tipo “moca”.

Em geral nas angiospermas, o desenvolvimento do ovário e formação dos frutos ocorre após a polinização da flor e a fertilização do óvulo. A polinização em *C. canephora* depende da transferência dos grãos de pólen da antera de uma flor para o estigma de outra, sendo que o vento é o principal agente físico polinizador do cafeeiro. Segundo Charrier (1972) esse agente é efetivo em distâncias de até 50 metros, entre os agentes biológicos estão as abelhas e outros insetos, que podem transportar os grãos de pólen a longas distâncias, sendo considerado efetivos até 700 metros de distância (ESCH e BURNS, 1996).

O florescimento do café é um evento fisiológico complexo que se divide em etapas e que se inicia com a indução floral e termina com a antese, passando por fases intermediárias de diferenciação dos primórdios florais e finalizando com o desenvolvimento da flor. O *Coffea canephora* é uma espécie de floração gregária, isto é, todas as plantas individuais, numa certa extensão geográfica, florescem juntamente (MENDES, 1949). As flores se abrem no início da manhã e permanecem abertas por todo o dia. Após a fertilização no período da manhã as anteras ficam escuras.

Alguns dias após a abertura das flores a corola branca se solta juntamente com as outras partes florais deixando o ovário que continua aderido a planta. Segundo Ferrão et al. (2007b), o estigma pode continuar receptivo por até seis dias após a abertura floral. O pólen do café é leve sendo facilmente dispersado pelo vento e pela ação de insetos, que atraídos pelo abundante néctar produzido pelas flores.

As espécies desse gênero, incluindo o *Coffea canephora*, normalmente produzem grãos de pólen com três núcleos, um núcleo vegetativo e dois núcleos germinativos, que correspondem às células reprodutivas que podem fecundar o óvulo. Esta estrutura tricelular encontra-se protegida por duas camadas, uma parede interna de celulose chamada de intina, um involúcro resistente constituído por ceras e proteínas. E uma camada externa denominada de exina que apresenta rugas que favorecem a fixação dos grãos de pólen (FERRÃO et al., 2007a).

Por sua vez as células epidérmicas do estigma são alongadas e formam papilas, pelos longos e ramificados que também favorecem a aderência dos grãos de pólen. O estigma é formado por um tecido glandular secretor de substâncias que produzem um ambiente adequado para a germinação dos grãos de pólen. Enquanto o estigma tem como função a recepção dos grãos de pólen, o estilo apresenta tecidos que permitem a passagem dos tubos polínicos. O tecido do estigma está ligado à cavidade do ovário através do tecido

estigmatóide, também chamado de tecido de transmissão, por onde os tubos polínicos desenvolvidos passam após seu crescimento celular.

Após a polinização os grãos de pólen que aderem ao estigma germinam formando um tubo polínico. Após a germinação os tubos polínicos se desenvolvem através do estilete, em direção ao ovário quimiotropicamente, levando um núcleo vegetativo e um núcleo germinativos. Ao alcançar o óvulo o tubo polínico penetra e libera as células espermáticas no interior do saco embrionário. Uma célula espermática fecunda a oosfera, originando o zigoto principal e a outra célula fecunda a célula central, originando um núcleo triplóide ($3n$), denominado a célula mãe do albúmen ou célula mãe do endosperma secundário (CONAGIN e MENDES, 1961).

Após a fecundação, por mitoses sucessivas a célula mãe do albúmen dá origem ao endosperma, um tecido de reserva. Por sua vez, o zigoto divide-se dando origem ao embrião, que paralisa o seu desenvolvimento e entra em estado de latência. O conjunto embrião, endosperma e tegumento é chamado de semente, que germinará quando as condições forem favoráveis.

2.3 - AUTOINCOMPATIBILIDADE EM PLANTAS (AI)

Diversas espécies vegetais apresentam mecanismos fisiológicos de base genética que impedem a fertilização das flores a partir de grãos de pólen produzidos pela própria planta. A autoincompatibilidade (AI) também pode ser definida como a incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando fertilizada por seu próprio pólen (SCHIFINO-WITTMAN e DALL'AGNOL, 2002). É uma característica do sistema reprodutivo de várias espécies cultivadas, tais como o maracujá, o cacau, o girassol, entre outras incluindo o *Coffea canephora* (BREWBAKER, 1957; DE NETTANCOURT, 1997).

A AI favorece a alogamia e a manutenção da variabilidade genética nas populações naturais sendo considerada como um fator determinante para o sucesso evolutivo das angiospermas (BREWBAKER, 1957; HESLOP-HARRISON, 1983). Devido a sua ampla distribuição entre as espécies vegetais, acredita-se a AI pode ter surgido antes da ocorrência de divergência evolutiva entre as espécies (WHITEHOUSE, 1951), assim como de maneira recorrente nos processos de especiação (BATEMAN, 1952). Segundo Charlesworth e Awadalla (1998), o gene S que governa a expressão dessa característica evoluiu a partir de origens independentes, diversas vezes, na evolução das plantas com flores.

Segundo Schifino-Wittmann e Dall'Agnol (2002), a AI também pode resultar em uma certa ineficiência reprodutiva. Enquanto que em algumas espécies como o trevo vermelho (*Trifolium pratense*), o gene S possui mais de 100 formas alélicas diferentes (LAWRENCE, 1996), em *Coffea canephora* diferentes trabalhos sugerem que de três a seis alelos determinam o sucesso da fecundação (CONAGIN e MENDES, 1961; BERTHAUD e CHARRIER, 1988).

Esse mecanismo fisiológico de base genética tem ação pré-zigótica atuando na possibilidade de fecundação dos gametófitos (grãos de pólen). Segundo Ferrão et al. (2004), em comparação com processos que atuam após a fecundação, impedindo o desenvolvimento dos zigotos (pós-zigóticos), os mecanismos pré-zigóticos conferem uma maior vantagem adaptativa para as espécies por não comprometer os óvulos, reduzindo consequentemente a produção de frutos.

A AI pode ser definida como homomórfica, quando não existem modificações florais resultantes entre as plantas, ou heteromórfica, quando há a modificação floral (SCHIFINO-WITTMAN e DALL'AGNOL, 2002). A AI heteromórfica é bem caracterizada nas espécies do gênero *Primula* e tem menor importância para as espécies cultivadas (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002). Estima-se que mais da metade das angiospermas apresentem mecanismos de autoincompatibilidade que não está associada a nenhum dimorfismo floral, mas que diferem entre si em relação ao seu mecanismo genético de controle.

Nas angiospermas existem dois tipos de AI, a gametofítica em que a especificidade da polinização é determinada pelo alelo S do grão do pólen, e a esporofítica, em que o controle genético é determinado pelo genótipo da planta adulta que deu origem ao grão de pólen (BUENO et al., 2006). No sistema de autoincompatibilidade gametofítica (AIG) o sucesso da polinização é determinado pela expressão do gene S do genoma haploide do grão do pólen. Por sua vez, na autoincompatibilidade esporofítica (AIE) o reconhecimento fisiológico é dado pela interação das proteínas produzidas pela planta doadora que deu origem ao grão pólen expressas na camada externa do grão de pólen (exina), com o estigma da planta receptora (FRANCESCHI, P. DE, et al., 2012).

Três diferentes mecanismos de autoincompatibilidade foram bem caracterizados:

- 1- Modelo Brassicaceae: Sistema do tipo esporofítico (AIE) de expressão governada por um único gene multialélico altamente polimórfico que expressa um receptor de membrana e um fator de ligação determinando a especificidade entre as papilas estigmáticas e o grão de pólen (DOUGHTY, J. et al., 1998);

- 2- O Modelo Papaveraceae: O reconhecimento das proteínas expressas pelo gene S é realizado por um receptor transmembrana que desencadeia uma rota de transdução de sinais, mediada por um gradiente de ânions de cálcio bivalentes (Ca^{2+}), resultando na inibição do tubo polínico incompatível (WHEELER et al., 1999);
- 3- O Modelo Solanacea, Rosacea e Rubiacea: Sistema de autoincompatibilidade gametofítica (AIG), presente no *Coffea canephora*, onde a reação de autoincompatibilidade é comandada por uma RNase (glicoproteína com função enzimática), expressa pelo gene S nos pistilos que degradam o RNA sintetizado pela célula vegetativa resultando na morte do tubo polínico (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002).

2.3.1- Autoincompatibilidade Esporofítica (AIE)

Por ser um tipo de AI, o sistema esporofítico também pode ser entendido como um mecanismo fisiológico de base genética cuja expressão é controlada por um único ou poucos genes que determinam o fenótipo dos grãos de pólen em relação a sua compatibilidade. No sistema esporofítico a reação de compatibilidade é determinada pelo genótipo diploide paterno, uma vez que os grãos de pólen possuem as proteínas de reconhecimento que são expressas pelo esporófito, ou seja, a planta produtora dos grãos de pólen. Como resultado deste processo o grão de pólen tem o fenótipo de incompatibilidade determinado pela planta que o produziu, sendo que em algumas espécies os alelos podem expressar relações de dominância ou de co-dominância (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002).

A reação de incompatibilidade ocorre com a inibição do desenvolvimento do tubo polínico no estigma da flor que cessa o seu desenvolvimento com a formação de calose em suas células (RAMALHO et al., 2008). A reação de compatibilidade ocorre após a germinação com a interação específica das proteínas presentes nos grãos de pólen e no estigma da planta (BRUCKNER et al., 2005). Nos cruzamentos compatíveis, a exina e a parede da célula do estigma interagem permitindo a absorção de água, a germinação e o desenvolvimento do tubo polínico.

A AIE é uma característica bastante estudada do sistema reprodutivo das espécies da família *Brassicaceae*. Nessa família, os mecanismos moleculares de reconhecimento e de rejeição dos grãos de pólen tem sua expressão governada por três genes (BRUCKNER et al. 2005). Os genes SRK (receptor da quinase), SLG (produtor da glicoproteína) e um terceiro gene, há muito procurado e recentemente descoberto, SCR, é responsável pela interação dos grãos de pólen com uma proteína rica em cisteína (SASSA et al., 2010). As quinases e as

glicoproteínas estão envolvidas na reação de sinalização da AI. A quinase-S é uma proteína de membrana que atua no reconhecimento pólen e estigma. A glicoproteína-S, apesar de não participar do reconhecimento dos grãos pólen atua na extensão da reposta de AI que resulta na paralisação do desenvolvimento dos tubos polínicos. Diferentes trabalhos têm caracterizado a importância da proteína rica em cisteína na reação de reconhecimento (GAUDE e DUMAS, 1990; DOUGHTY et al., 1998; McCUBBIN e KAO, 1999).

2.3.2- Autoincompatibilidade Gametofítica (AIG)

A principal diferença entre os sistemas esporofítico e gametofítico está no fenótipo do grão de pólen, que no sistema gametofítico é determinado pelo alelo do gene S presente no genoma haploide do grão de pólen. Segundo Sassa al. (2010), a maneira com que as proteínas de reconhecimento atuam nesses sistemas diferenciam seus mecanismos de reconhecimento. No sistema AIG os fatores inibidores, ou seus precursores, são expressos após a anáfase da primeira divisão meiótica durante a microesporogênese, enquanto, no sistema esporofítico os fatores são produzidos antes da divisão reducional que ocorre na anáfase I. Por esse motivo, no sistema gametofítico são produzidos dois pares de esporos fenotipicamente diferentes na tétrade enquanto no sistema esporofítico todos os esporos apresentam o mesmo fenótipo (BREWBAKER, 1957).

Em muitas espécies, incluindo o *Coffea canephora*, a autoincompatibilidade gametofítica têm sua expressão governada um gene multialélico identificado pela letra S (BERTHAUD e CHARRIER, 1988). Sendo que a interação grãos de pólen e estigma é determinado pelo polimorfismo do gene S, do inglês “Sterility locus” que está associado à expressão de uma glicoproteína como a S-RNase citotóxica na fração pólen e pistilo (SASSA, et al. 2010). A reação de autoincompatibilidade está relacionada a parada no desenvolvimento do tubo polínico ao longo do estilete, que possui o mesmo alelo do pólen. A paralisação no crescimento do tubo polínico deve-se a ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico impedindo o crescimento do tubo polínico (CASTRIC e VEKEMANS, 2004).

No entanto, também existem casos de controle bifatorial e mesmo polifatorial da AIG, o mais conhecido é o sistema de dois locos, típico da família *Poaceae*. (POEHLMAN e SLEPER, 1995). Nesse sistema um dos alelos de ambos os genes presentes no pólen haploide e no estigma diploide podem sinalizar a paralisação dos tubos polínicos. Nesse caso quando os alelos dos genes S ou o Z não apresentam correspondência com os alelos do estigma, o cruzamento é compatível (POEHLMAN e SLEPER, 1995). Controle bifatorial da AIG ocorre em plantas da família *Solanaceas*. Em *Beta vulgaris esculenta* (beterraba – *Quenopodiáceas*)

foram descritos quatro diferentes genes controlando a AIG (DE NETTANCOURT, 1997; RICHARDS, 1997), assim como em *Ranunculus repens*, uma planta tetraplóide (LUNDQVIST, 1998).

Na autoincompatibilidade gametofítica os tubos polínicos só irão se desenvolver se o alelo presente no grão de pólen haploide for diferente dos alelos presentes no estilete diploide. Várias espécies de importância econômica, incluindo o *Coffea canephora* fazem parte das famílias Solanácea, Rosácea e Rubiaceae que apresentam autoincompatibilidade gametofítica. Nessas famílias a reação de incompatibilidade é comandada por uma RNase (glicoproteína com função enzimática), expressa pelo gene S nos pistilos que degradam o RNA sintetizado pela célula vegetativa resultando na morte do tubo polínico (ANDERSON et al., 1989). RNases estão presentes desde a superfície das papilas estigmáticas, tecido condutor do estilete, até o ovário, o que coincide com o trajeto do tubo polínico. Segundo Haring et al. (1990) as RNases paralisam o crescimento do tubo polínico por meio da degradação do RNA, associado a um gradiente de Ca^{+2} também associado à reação de AI (WHEELER et al., 1999).

2.4 - AUTOINCOMPATIBILIDADE EM *Coffea canephora* Pierre

O *Coffea canephora* é uma espécie alógama, da família Rubiaceae que apresenta autoincompatibilidade do tipo gametofítica que favorece a alogamia em populações naturais dessa espécie, contribuindo para a manutenção da variabilidade genética. A reação de incompatibilidade ocorre entre o tubo polínico e o grão de pólen, que não deve compartilhar o mesmo alelo da planta receptora (LASHERMES et al., 1996; NOWAK et al., 2011).

Nesta espécie a autoincompatibilidade têm sua expressão governada por apenas um gene multialélico identificado pela letra S (BERTHAUD e CHARRIER, 1988). A reação de autoincompatibilidade está relacionada com a parada no desenvolvimento do tubo polínico ao longo do estilete, que possui o mesmo alelo do pólen. A paralisação no crescimento do tubo polínico deve-se a ação de ribonucleases que degradam o RNA ribossômico impedindo o crescimento do tubo polínico (CASTRIC e VEKEMANS, 2004).

Atualmente, existem evidências filogenéticas de que a homologia do gene S das Solanaceas e das Rosaceas apresentem única origem evolutiva desenvolvida a partir de uma antiga linhagem ancestral Eudicotiledônea, para seus dois clados principais Rosídeas e Asterídeas, ao qual pertence a espécie *Coffea canephora* (NOWAK et al., 2011). A RNase T2 é uma ribonuclease com atividade seletiva expressa em diversos tipos de tecidos, em resposta ao stress físico ou induzido por patógenos (WHEELER, E. et al., 1999). Essas proteínas têm

sido objeto de muitos estudos bioquímicos e funcionais, apresentando vários sítios ativos e conservados. As ribonucleases podem ser agrupadas em três classes (I, II, ou III) com base em motivos estruturais conservados e história evolutiva (NOWAK et al., 2011). As RNases T2 são expressas constitutivamente e podem conter cinco regiões conservadas que se distinguem por motivos de aminoácidos específicos e por apresentarem uma ou duas regiões de elevada variabilidade genética que podem ser exploradas no estudo do seu polimorfismo (SASSA, et al., 2010).

Contrariando expectativas teóricas de que este gene deveria apresentar alto polimorfismo genético, o baixo polimorfismo alélico observado em *Coffea canephora* sugere que esta espécie passou por um gargalo genético em seu passado (NOWAK, 2011). O mecanismo de determinação da compatibilidade coloca o gene S sob seleção negativa dependente da frequência, o que significa que a frequência de um alelo é inversamente proporcional ao seu valor adaptativo (FALCONER, 1981). Ou seja, os indivíduos em uma população portadores de formas alélicas mais raras desse gene, se beneficiam da maior frequência de potenciais plantas doadoras de pólen, fazendo com que a taxa de fecundidade de um indivíduo seja inversamente proporcional à frequência do alelo na população. Estas condições têm algumas implicações importantes: nenhuma das formas alélicas pode se fixar na população, a taxa de mudança é maior do que em um loco neutro e os indivíduos da população serão altamente heterozigóticos.

Além da autoincompatibilidade *Coffea canephora*, também apresenta outros mecanismos que favorecem a polinização cruzada, tais como, o florescimento sincronizado e a abundante produção de pólen (CHARRIER e BERTHAUD, 1988). Suas flores apresentam pedúnculo curto e ovário ínfero provido de dois lóculos que abrigam óvulos independentes. Nesta espécie a taxa natural de ocorrência de grãos tipo “moca” resulta da polinização de apenas uma das duas lojas do ovário. Quando isso acontece, o grão fecundado apresenta formato arredondado, diferentemente do grão tipo chato que se caracteriza por apresentar duas faces (uma chata e outra convexa), resultado da polinização das duas lojas adjacentes (CARVALHO et al., 1983).

Embora poucos trabalhos tenham mensurado o efeito prejudicial da autoincompatibilidade em café Conilon (FERRÃO et al., 2007b; BRAGANÇA et al., 2001), o plantio de genótipos não compatíveis pode aumentar a taxa de grãos tipo moça e diminuir a produtividade de grãos. Na cafeeicultura clonal, o plantio de clones não compatíveis, pode comprometer a produtividade e a qualidade dos grãos da lavoura pelo isolamento de plantas

não compatíveis (Figura 2). Na composição de uma cultivar sintética clonal, os clones devem ser selecionados considerando sua capacidade de polinização (FERRÃO et al., 2007b).

O reduzido número de trabalhos científicos disponíveis na literatura contrasta com a expressiva variabilidade genética dessa espécie. Segundo Conagin e Mendes (1961), um dos primeiros trabalhos a observar a autoincompatibilidade em cafeeiros foi realizado por Von Faber em 1910 que descreveu o desenvolvimento dos tubos polínicos no momento da polinização. Devreux et al (1959) observaram que após a autopolinização, o tubo polínico não se desenvolve não permitindo que o grão de pólen chegue até o ovário. Conagin e Mendes (1961) e Berthaud e Charrier (1988) levantaram evidências de que a autoincompatibilidade em *Coffea canephora* deve ser governada pela ação de um único gene S, com três formas alélicas (S_1 , S_2 , S_3). Mais recentemente no centro de origem e de diversificação desta espécie, Omolaja e Fawole (2004) quantificaram a interação de cinco formas alélicas na expressão desta característica. Lashermes et al. (1996) identificaram um marcador molecular associado a essa característica pelo desenvolvimento de populações duplo-haploídes, homozigotas para o gene S. Ramalho et al. (1990) descreveram que a incompatibilidade deve-se a ação de glicoproteínas específicas no estigma da flor que interagem com as proteínas dos alelos S idênticos, que se combinam para formação de dímeros.



Figura 2. Detalhe da lavoura de café clonal no município de Rolim de Moura, plantados em linha, em que um clone não floresceu no mesmo dia dos demais, portanto havendo falha na sincronia da polinização. Foto: Frederico José Evangelista Botelho.

2.5 - AUTOINCOMPATIBILIDADE E MELHORAMENTO

Na agricultura moderna, duas estratégias principais são consideradas para o aumento da produtividade por área: o plantio de materiais genéticos superiores e a melhoria das condições de cultivo. Em diversas culturas têm sido quantificada uma relação aditiva entre esses fatores, resultado da expressão do potencial genético superior com a melhoria das condições de cultivo (SHUSTER e CRUZ, 2004).

No melhoramento genético clássico de *Coffea canephora*, objetiva-se a seleção de plantas de elevado potencial produtivo com bebida de qualidade superior, associadas à maior uniformidade de maturação dos frutos, resistência à ferrugem alaranjada e tolerância a insetos-pragas (BERTHAUD, 1985; FERRÃO, 2007a).

O Estado de Rondônia destaca-se pela sua aptidão para cultivo do *Coffea canephora* em regime de agricultura familiar, com cafezais pequenos de até 10 hectares. Em geral, o nível de tecnologia empregado nessas lavouras é baixo, sendo que a maior parte do café, ainda é comercializada com grande percentual de frutos verdes. A seleção de plantas de maior potencial produtivo e melhor uniformidade de maturação é considerada uma alternativa para aumento da produtividade sem aumento de custos adicionais.

Além dos procedimentos de propagação do cafeeiro, a estrutura das populações de melhoramento também depende do sistema reprodutivo dessa espécie que impede a ocorrência de cruzamentos entre indivíduos aparentados de uma geração para a outra. Ao favorecer a fecundação cruzada, a autoincompatibilidade favorece a manutenção da variabilidade genética diminuindo a possibilidade de expressão de alelos recessivos e dos efeitos causados pela depressão endogâmica. Uma vantagem prática da AI na realização de cruzamentos está na utilização do progenitor feminino sem a necessidade de emasculação das flores.

No entanto, a AI também pode ser considerado como uma limitação para os programas de melhoramento. Ao impedir a autofecundação, a AI também impede a obtenção de linhas puras. Diferentes trabalhos utilizaram diferentes estratégias para realizar autofecundações em plantas autoincompatíveis. Entani et al. (1999) conseguiram autofecundar flores ao utilizar grãos de pólen que estavam armazenados por longos períodos. De Nettancourt (1997) e Richards (1997) obtiveram sucesso na autofecundação a partir da polinização forçada em fase de botão floral. Nestes casos a reação de AI é reduzida permitindo a ocorrência de alguns cruzamentos. Esse fenômeno é denominado compatibilidade fora de temporada ou fim de estação. Irradiação, hormônios (HASENSTEIN e ZAWADA, 2001), altas temperaturas,

soluções salinas (CARAFA e CARRATU, 1997), aplicação de CO₂ (LEE et al., 2001), indução de estresse (TEZUKA et al., 1997), são tratamentos que podem ser utilizados para levar a um colapso fisiológico e temporário da AI, permitindo autopolinizações. Outra maneira de superar a barreira da AI é a fertilização direta no ovário, como realizado por Westwood et al. (1997).

Embora a autoincompatibilidade dificulte a obtenção de linhas puras, outra possibilidade uso da AI está na produção de sementes híbridas, sem a utilização do sistema de macho esterilidade (MICHAELSON-YEATES et al., 1997). Uma vantagem do uso de AI em relação à esterilidade citoplasmática para a produção de sementes híbridas está no fato de que todas as plantas no campo podem produzir sementes. Entretanto a maior desvantagem reside na necessidade de campos de recombinação isolados. Em função disso, poucos híbridos comerciais foram produzidos com a utilização da AI (BURTON, 1983).

2.6 - MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A partir de sua invenção por volta de quatrocentos anos atrás, o microscópio tem sido de fundamental importância no estudo de estruturas orgânicas e inorgânicas, tornando-se um utensílio indispensável para o desenvolvimento de pesquisas científicas (BALDANI et al., 1998).

O conjunto de lentes de um microscópio é formado pelas objetivas e oculares. A objetiva tem como principal função captar a luz filtrada pelo condensador e formar uma imagem real, invertida e ampliada. E a lente ocular faz com que a imagem formada seja aumentada através da objetiva, para que seja visualizada pelo olho do observador (MAUCH-MANI e MAUCH, 2005).

A microscopia de fluorescência é uma técnica que se fundamenta na irradiação da luz de diferentes comprimentos de onda no momento em que determinadas substâncias são irradiadas em um determinado comprimento de onda (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Essa técnica se fundamenta na utilização de corantes fluorescentes que faz com que determinadas estruturas sejam realçadas quando visualizados com a luz em diferentes comprimentos de onda (MAUCH-MANI e MAUCH, 2005).

A microscopia de fluorescência apresenta seletividade e possui potencial para ser quantitativa e qualitativa, além de não influenciar nos resultados mesmo com a presença de água (MILORI et al., 2002). Outra vantagem é o ganho de contraste, no entanto é necessário um custo adicional com a obtenção de equipamentos (BALDANI et al., 1998).

O azul de anilina é um corante amplamente utilizado na microscopia de luz transmitida, já conhecido na microscopia vegetal para realçar os tubos polínicos (MAUCH, 2005). Esse corante apresenta alta afinidade pelas caloses presentes nos tubos polínicos. Bioquimicamente as caloses podem ser entendidas como um polissacarídeo presente em menor concentração nas paredes celulares e nos plasmodesmos e em maior concentração no espermatófito e gametófito após a divisão meiótica, aumentando o contraste dos tubos polínicos que se desenvolvem dentro do estigma (MAUCH-MANI e MAUCH, 2005).

A Figura 3 mostra o estigma de uma flor de *Coffea canephora* observada em microscopia de fluorescência (NOWAK et al., 2011), destacando as estruturas dos grãos de pólen, tubo polínico e estigma.

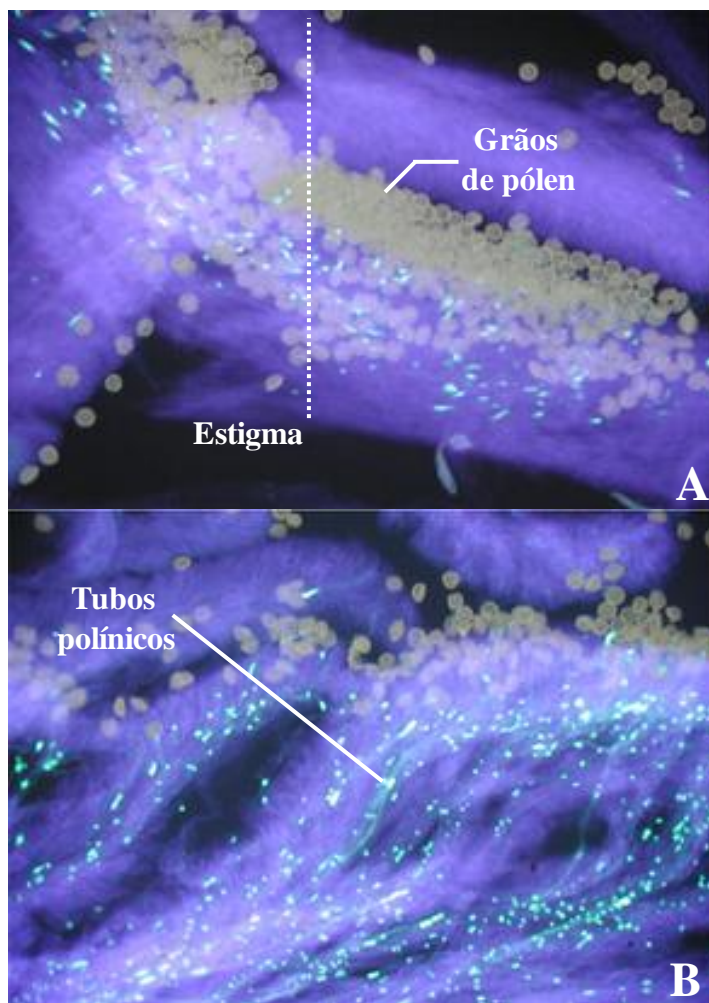


Figura 3. Imagens utilizando microscopia de fluorescência em aumento de 20 vezes (A) e 40 vezes (B) da estrutura dos grãos de pólen e dos tubos polínicos no estigma da flor 30 horas após a polinização. Figura adaptada de Nowak et al. (2011).

2.7 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY WEINBERG

Um dos aspectos mais importantes no modo de reprodução de populações alógamas foi o descrito a primeira vez por Wilhelm Weinberg e Godfrey Harold Hardy (BORÉM e MIRANDA, 2013). Ambos estudaram o que é conhecido hoje como o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, princípio da Genética de Populações que investiga da dinâmica nas populações buscando elucidar mecanismos que alteram as frequências alélicas e genotípicas de uma população. O efeito da seleção natural, deriva genética, mutação e fluxo gênico, cruzamentos consanguíneos foram estudados e resultaram em conclusões concordantes obtidas por esses dois autores que passaram a ser conhecidas como a lei do equilíbrio de Hardy e Weinberg (BORÉM e MIRANDA, 2013).

Segundo essa lei se não existirem fatores evolutivos atuando sobre as populações, as frequências alélicas e genotípicas permanecem inalteradas ao longo do tempo. Nesse princípio uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg deve se aproximar das seguintes condições, que na prática não são atendidas apenas parcialmente: 1) a população é infinita; 2) os acasalamentos ocorrem ao acaso; 3) todos membros da população são igualmente férteis; 4) não há efeito da seleção; 5) não ocorrem migrações; e 6) não ocorrem mutações gerando novos alelos (CONTI, F., 2009).

A avaliação das mudanças na frequência genotípicas de uma geração para a outra pode ser feita utilizando o teste de qui-quadrado. O teste qui-quadrado simbolizado por χ^2 é um teste de hipóteses não paramétrico, ou seja, não depende dos parâmetros populacionais, como média e variância. O princípio básico deste método é comparar proporções, isto é, a diferença entre as frequências observadas e esperadas para um determinado evento. Pode-se dizer que dois grupos se comportam de forma semelhante se as diferenças entre as frequências observadas e as esperadas em cada categoria forem muito pequenas, próximas a zero. Portanto, o teste é utilizado para verificar se a frequência com que um determinado acontecimento observado em uma amostra se desvia significativamente ou não da frequência com que ele é esperado e comparar com o objetivo de avaliar se as proporções observadas destes eventos mostram ou não diferenças significativas ou se as amostras diferem significativamente quanto às proporções desses acontecimentos (CONTI, F., 2009).

No melhoramento de plantas, estudos sobre o padrão de segregação de uma característica permitem direcionar cruzamentos e prever o comportamento das progênes mais promissoras fazendo com que modelos biométricos sejam de grande importância para tomar

de decisões e para lidar com as incertezas. Em essência para o cálculo de probabilidades é necessário contar o número de situações em que um evento ocorre em relação ao total de ocorrências (CRUZ, C. D., 2005).

Considerando o sistema de autoincompatibilidade do *Coffea canephora* de natureza gametofítica e que apresenta expressão controlada por apenas um gene multialélico são esperados cruzamentos totalmente compatíveis; parcialmente compatíveis e não compatíveis.

No café conilon três níveis de compatibilidade entre plantas são esperados: (1) polinização auto-incompatível: ocorre quando os genitores apresentam formas alélicas idênticas (Ex.: $S_1S_2 \times S_1S_2$); (2) compatibilidade parcial: ocorre quando os genitores possuem uma forma alélica em comum (Ex.: $S_1S_2 \times S_1S_3$), (3) compatibilidade total: ocorre quando as formas alélicas são diferentes (Ex.: $S_1S_2 \times S_3S_4$) (CHARLESWORTH e GUTTMAN, 1997; FAZUOLI, 1986). Embora avaliações no centro de origem indiquem a existência de até cinco formas alélicas do gene S (OMOLAJA e FAWOLE, 2004), observações de campo indicam a predominância de apenas três formas alélicas na expressão desta característica em germoplasma brasileiro.

De maneira equivocada pode-se supor que o resultado de cruzamentos parcialmente compatíveis seja 50% de lojas fecundadas e 50% de lojas não fecundadas. No entanto, essas proporções não se realizam uma vez que a autoincompatibilidade é um mecanismo pré zigótico e a polinização de grãos de pólen não compatíveis não impede a germinação e o desenvolvimento dos tubos polínicos de grãos de pólen compatíveis. A Figura 4 ilustra vários tubos se desenvolvendo ao mesmo tempo em um cruzamento compatível, visualizado nos aumentos de 10x e 20x da hibridação direcionada dos clones 194 e 125.

Sistemas de autoincompatibilidade pré-zigóticos conferem uma vantagem adaptativa em relação aos pós-zigóticos favorecendo a fertilização de grãos de pólen geneticamente divergentes, protegendo os zigotos que não tem seu desenvolvimento afetado diminuindo a produção de frutos.

Assim o cruzamento entre duas plantas parcialmente compatíveis pode naturalmente resultar em taxas superiores a 50% de fertilização, e o percentual de ocorrência de grãos moca não pode ser utilizado para inferir sobre o genótipo do gene S, uma vez que a eficiência da polinização depende do transporte, germinação e desenvolvimento do tubo polínico de grãos de pólen compatíveis.

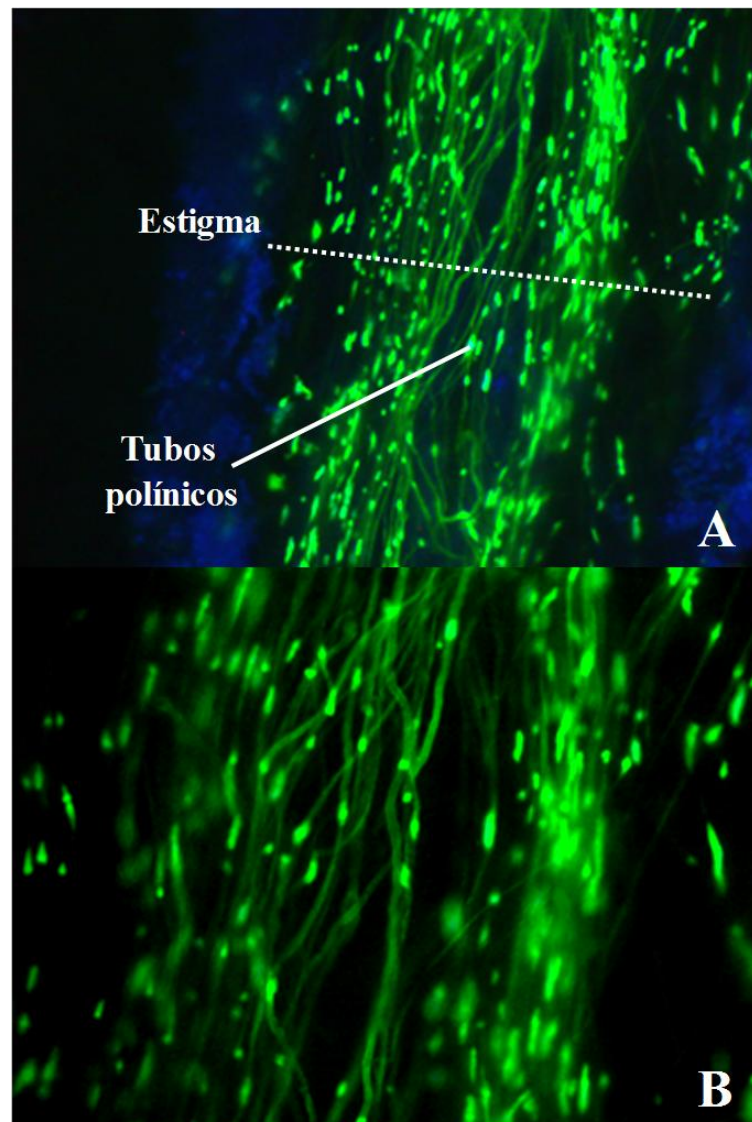


Figura 4. Imagens do desenvolvimento dos tubos polínicos 30 horas após a hibridação direcionada entre os clones 194 e 125 utilizando microscopia de fluorescência em aumento de 10 vezes (A) e 20 vezes (B). Foto: Tatiane Almeida Lopes

O estudo da segregação do gene S é de natureza complexa devido ao grande número de combinações (N) que podem ser obtidas na avaliação de um número relativamente pequeno de plantas. Para tentar simplificar esta questão Lashermes et al.(1996) desenvolveu populações duplo haploides, obtidas a partir da duplicação do genoma haploide, e por isso homozigotas para o gene S. Apesar das populações duplo haploides permitirem a fixação um único alelo e obtenção da segregação de apenas duas classes genotípicas, o seu desenvolvimento é um processo dispendioso e demorado e que não permite realizar avaliações de plantas na rotina dos programas de melhoramento.

Um grupo de compatibilidade é formado por indivíduos que possuem o mesmo genótipo para o gene S, e por este motivo, não são compatíveis. O número de combinações (N), definido como o número de maneiras diferentes que os genótipos podem se organizar nos grupos de compatibilidade aumenta de maneira exponencial em relação ao número de grupos de compatibilidade e de genótipos em avaliação:

$$(i) \quad N = C^g$$

Em que: N = número possível de combinações que podem ser obtidas entre g genótipos e C grupos de compatibilidade.

A Tabela 1 mostra o número possível de combinações que podem ser obtidas em função do número de genótipos em avaliação e do número de grupos de compatibilidade. Devido à essa relação exponencial a avaliação de poucas dezenas de plantas resulta em mais de 10^9 resultados possíveis, limitando a caracterização em larga escala da compatibilidade nos grupos de melhoramento. Para possibilitar essa avaliação entende-se que a utilização de plantas testadora dos grupos de compatibilidade, tem potencial para aumentar qualitativamente a eficiência das avaliações de campo reduzindo o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos do gene S.

Tabela 1. Número possível de combinações que podem ser obtidas na avaliação de n clones em g grupos de compatibilidade.

| Genótipos | Número de grupos de compatibilidade | | | |
|-----------|-------------------------------------|-------------|----------------|-----------------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 2 | 4 | 9 | 16 | 25 |
| 3 | 8 | 27 | 64 | 125 |
| 4 | 16 | 81 | 256 | 625 |
| 5 | 32 | 243 | 1024 | 3.125 |
| 6 | 64 | 729 | 4.096 | 15.625 |
| 7 | 128 | 2.187 | 16.384 | 78.125 |
| 8 | 256 | 6.561 | 65.536 | 390.625 |
| 9 | 512 | 19.683 | 262.144 | 1.953.125 |
| 10 | 1.024 | 59.049 | 1.048.576 | 9.765.625 |
| 11 | 2.048 | 177.147 | 4.194.304 | 48.828.125 |
| 12 | 4.096 | 531.441 | 16.777.216 | $2,44.10^8$ |
| 13 | 8.192 | 1.594.323 | 67.108.864 | $1,22.10^9$ |
| 14 | 16.384 | 4.782.969 | $2,68.10^8$ | $6,1.10^9$ |
| 15 | 32.768 | 14.348.907 | $1,07.10^9$ | $3,05. 10^{10}$ |
| 16 | 65.536 | 43.046.721 | $4,29.10^9$ | $1,53. 10^{11}$ |
| 17 | 131.072 | $1,29.10^8$ | $1,72.10^{10}$ | $7,63. 10^{11}$ |
| 18 | 262.144 | $3,87.10^8$ | $6,87.10^{10}$ | $3,81. 10^{12}$ |
| 19 | 524.288 | $1,16.10^9$ | $2,75.10^{11}$ | $1,91.10^{13}$ |
| 20 | 1.048.576 | $3,49.10^9$ | $1,1.10^{12}$ | $9,54.10^{13}$ |
| ... | ... | ... | ... | ... |
| g | 2^g | 3^g | 4^g | 5^g |

Em contraste com os resultados de Omolaja e Fawole (2004) que observaram a ocorrência de cinco diferentes formas alélicas no centro de origem dessa espécie, avaliações sem populações brasileiras têm indicado a existência de apenas três alelos (CONAGIN e MENDES, 1961.; FERRÃO et al., 2007a). A determinação do número de formas alélicas para esse gene é importante, pois determina o número de grupos de compatibilidade da população de melhoramento. A possibilidade de identificar novos alelos do gene S em germoplasma brasileiro abre a possibilidade para uma redução expressiva no percentual de grãos moca, pelo favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis.

O número de grupos de compatibilidade é função do número de genes, de alelos e das interações dos alelos do gene que determina a expressão do mecanismo de reconhecimento da compatibilidade. Em *Coffea canephora*, que apresenta AIG de expressão governada por um

único gene co-dominante, o número de alelos e o número de grupos de compatibilidade apresenta a seguinte relação:

Tabela 2. Relação entre o número de grupos de compatibilidade que podem ser obtidos a partir de diferentes números de alelos do gene S.

| Nº de alelos | Formas alélicas | Nº de grupos |
|--------------|---|--------------------|
| 3 | S ₁ S ₂ S ₃ | 3 |
| 4 | S ₁ S ₂ S ₃ S ₄ | 6 |
| 5 | S ₁ S ₂ S ₃ S ₄ S ₅ | 10 |
| 6 | S ₁ S ₂ S ₃ S ₄ S ₅ S ₆ | 15 |
| ... | ... | ... |
| n | S _n S _(n-1) | $\frac{n(n-1)}{2}$ |

A caracterização dos números de alelos associados à expressão dessa característica nas populações de melhoramento subsidia a realização de hibridações direcionadas considerando a segregação dessa característica nas progênes e indivíduos em seleção.

No cruzamento entre plantas de diferentes grupos de compatibilidade metade da descendência será do mesmo genótipo da planta doadora (macho) e a outra metade será de um grupo diferente dos genitores. Uma vez que o mecanismo de AIG impede o desenvolvimento dos tubos polínicos de grãos de pólen com o mesmo genótipo da planta receptora, não existe naturalmente genótipos homozigotos para essa característica. Do cruzamento entre plantas dos grupos I e III espera-se que metade da descendência seja do grupo I e a outra metade do grupo III. Considerando a ocorrência de 3 alelos, como sugerido por Ferrão et al. (2007b), pode ocorrer os seguintes cruzamentos (Tabela 3):

Tabela 3. Descendência esperada do cruzamento entre os genitores compatíveis, considerando três formas alélicas ao gene S em população de *Coffea canephora*.

| Genitor Masculino ♂ | Genitor Feminino ♀ | | |
|-----------------------------------|---|---|---|
| | S₁S₂ | S₁S₃ | S₂S₃ |
| S₁S₂ | Incompatível. | $\frac{1}{2} S_1S_2 + \frac{1}{2} S_2S_3$ | $\frac{1}{2} S_1S_2 + \frac{1}{2} S_1S_3$ |
| S₁S₃ | $\frac{1}{2} S_1S_3 + \frac{1}{2} S_2S_3$ | Incompatível | $\frac{1}{2} S_1S_3 + \frac{1}{2} S_1S_2$ |
| S₂S₃ | $\frac{1}{2} S_2S_3 + \frac{1}{2} S_1S_3$ | $\frac{1}{2} S_2S_3 + \frac{1}{2} S_1S_2$ | Incompatível |

Com a ocorrência de acasalamentos ao acaso as frequências alélicas e genotípicas irão se manter de uma geração para outra (FALCONER,1981). Para determinar as frequências genotípicas e alélicas na população deve-se considerar a incompatibilidade no momento da polinização, de forma que as frequências p, q e r estão associadas às formas alélicas S₁, S₂ e S₃:

- $P(S_1S_1) = p^2 = 0$ (cruzamento incompatível)
- $P(S_1S_2) = 2pq$
- $P(S_1S_3) = 2pr$
- $P(S_2S_2) = q^2 = 0$ (cruzamento incompatível)
- $P(S_2S_3) = 2qr$
- $P(S_3S_3) = r^2 = 0$ (cruzamento incompatível)

As probabilidades de ocorrência dos genótipos são dadas por:

▪
$$P(S_1S_2) = \frac{2pq}{1 - p^2 - q^2 - r^2}$$

▪
$$P(S_1S_3) = \frac{2pr}{1 - p^2 - q^2 - r^2}$$

▪
$$P(S_2S_3) = \frac{2qr}{1 - p^2 - q^2 - r^2}$$

2.8 - ESTIMATIVAS DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA

Tendo em vista que todos os procedimentos de hibridação direcionada tem uma probabilidade de erro, e que uma genealogia é obtida a partir da informação de um grande número de hibridações, desenvolveu-se um teste probabilístico para determinar a probabilidade de ocorrência de diferentes genealogias em relação a hipótese de nulidade de que todos os genótipos fazem parte do mesmo grupo de compatibilidade.

Quando não existem informações sobre uma determinada população, não há motivos para supor a existência de dois, três ou mais grupos de compatibilidade, de modo que a hipótese H_0 a ser testada é de que todos os indivíduos de uma população fazem parte do mesmo grupo de compatibilidade.

No estudo do padrão de herança é importante considerar que cada procedimento tem uma probabilidade de erro, devido às condições de manipulação ou de ambiente. Dois tipos de erros estão associados ao teste de hipóteses. O erro tipo I, denominado de falso positivo, que ocorre quando devido a uma contaminação do procedimento, rejeita-se equivocadamente a hipótese H_0 , de que todos os indivíduos fazem parte do mesmo grupo de compatibilidade. E o erro tipo II, denominado de falso negativo, que ocorre quando devido a uma falha no procedimento, equivocadamente aceita-se a hipótese H_0 .

Segundo Krug (1938) e Charrier e Eskes (2004) a contaminação é uma das fontes de erro mais importantes na hibridação direcionada de *Coffea canephora*. Na natureza o vento é o principal agente físico que atua na transferência dos grãos de pólen da antera de uma flor para o estigma de outra. Segundo Charrier (1972), esse agente é efetivo em distâncias de até 50 metros. Abelhas e outros insetos também são importantes agentes polinizadores que podem transportar os grãos de pólen a longas distâncias, sendo considerado efetivos até 700 metros de distância (ESCH e BURNS, 1996). Cuidados com a ação desses insetos devem ser tomados considerando a proteção das inflorescências e aplicação de inseticidas sistêmicos, quando em casa de vegetação para proteção contra insetos polinizadores (*Trypys* spp.). A abertura não sincronizada das flores também é um fator impeditivo para a realização de cruzamentos controlados.

Para inferir o agrupamento de maior probabilidade de ocorrência em função dos resultados obtidos pode ser utilizado o método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood Estimation). Para a utilização deste método é necessário o conhecimento da função de densidade de probabilidade da variável aleatória em estudo. Considera-se que a probabilidade de ocorrência das classes genotípicas, nas populações segregantes avaliadas

neste estudo, assumem distribuição multinomial, função do número de formas alélicas do gene S apresentada a seguir segundo notação de Schuster e Cruz (2004):

$$L(p_i / n_i) = \lambda p_1^{n_1} p_2^{n_2} p_3^{n_3} \dots p_n^{n_n}; \lambda = \frac{N!}{n_1! n_2! \dots n_n!}; N = \sum_{i=1}^n n_i;$$

Em que: N é o número de grupos de compatibilidade, n_i é o número de plantas de determinada classe genotípica que fazem parte do i -ésimo grupo de compatibilidade, com probabilidade p_i .

Considerando uma taxa de erro de 5%, utilizou-se o teste da razão de verossimilhança para identificar a genealogia de máxima probabilidade de ocorrência. Este teste consiste na comparação entre o estimador de máxima verossimilhança (θ_A) e de ocorrência da hipótese nula (θ_N), de que todos os indivíduos fazem parte de um mesmo grupo de compatibilidade:

$$Z = \text{Log}_{10} \left[L \frac{(\theta_A / x)}{(\theta_N / x)} \right]$$

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- HIBRIDAÇÕES DIRECIONADAS E SELEÇÃO DE PLANTAS TESTADORAS

Hibridações direcionadas foram realizadas nos anos de 2013 e 2014, em casa de vegetação e em campo na Embrapa Rondônia – Porto Velho/RO, situado na BR 364 km 5,5 sentido Cuiabá, Zona rural CEP 76815-800. O clima predominantemente é o tropical tipo AM (classificação Köppen): quente e úmido, com período seco bem definido, ocorrência de déficit hídrico de junho a setembro, temperatura média anual de 25°C, precipitação média anual de 2.354 mm e evapotranspiração média anual de 851 mm.

As hibridações foram realizadas em delineamento de dialelo parcial sem genitores e sem recíprocos para caracterização da genealogia do gene S que governa a expressão dessa característica (Tabela 4). Os clones avaliados fazem parte da variedade BRS Ouro Preto, variedade clonal composta por 15 clones superiores de maturação intermediária, de produção média de 70,6 sacas, recomendada para plantio nas condições edafoclimáticas do Estado de Rondônia (RAMALHO et al., 2008).

Tabela 4. Esquema em dialelo completo das hibridações direcionadas realizadas entre clones superiores de *Coffea canephora*. Embrapa Rondônia – Porto Velho 2014.

| Clones | 194 | 125 | 160 | 130 | 199 |
|--------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 194 | | Y _{1.2} * | Y _{1.3} * | Y _{1.4} * | Y _{1.5} |
| 125 | | | Y _{2.3} * | Y _{2.4} * | Y _{2.5} |
| 160 | | | | Y _{3.4} * | Y _{3.5} |
| 130 | | | | | Y _{4.5} |
| 199 | | | | | |

*As hibridações marcadas com um asterisco também foram avaliadas em campo.

Em casa de vegetação as plantas foram conduzidas por 24 meses, em vasos de 20 litros, utilizando como substrato três partes de solo para uma parte de areia e uma parte de esterco curtido. Para evitar o florescimento durante a fase desenvolvimento das mudas, os vasos foram irrigados com molhamento diário da parte aérea, mantendo-se a umidade do solo

próxima a 80% da capacidade de campo. A adubação de cobertura foi feita considerando as características do solo segundo indicações de Marcolan et al. (2009), sendo N-500, P-200, K-500, Mg- 45, S- 56, Cu-1,5, B-0,5; Mn-10, Zn-5, Fe-5 e Mo-0,2 mg.L por planta parceladas a cada 30 dias.

Para induzir o florescimento das plantas que após 18 meses de crescimento apresentavam botões florais em dormência foi utilizado o manejo da irrigação, com a redução gradativa até atingir uma umidade equivalente a 30% da capacidade de campo. Após um período de 15 dias de condução em condições de baixa umidade, foram realizadas duas irrigações concentradas com magnitude de precipitação, seguido da condução das plantas na capacidade de campo em 80%, sem molhamento da parte aérea (Figura 5).

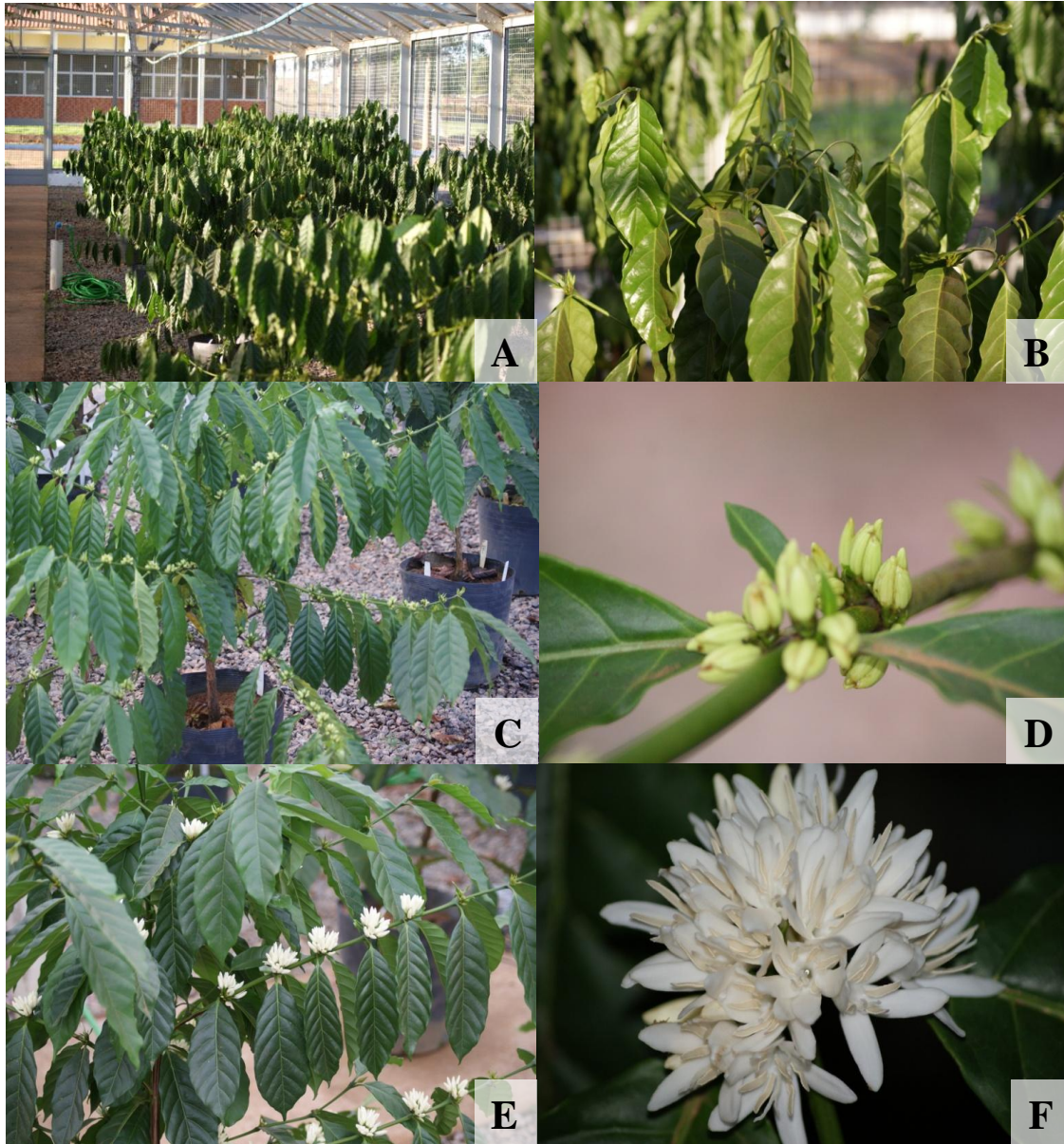


Figura 5. Indução do florescimento realizado em casa de vegetação: **A e B:** Plantas mostrando sinais de déficit hídrico, **C e D:** Quebra de dormência dos botões florais com a irrigação das plantas após período de déficit hídrico, **E:** Desenvolvimento das flores e antese, **F:** antese no momento da hibridação. Foto: Hilder Afonso

Um dia antes da antese, os ramos plagiotrópicos com botões florais foram protegidos utilizando sacos de papel do tipo kraft de 55x25cm. As polinizações foram realizadas entre 8 e 10 horas da manhã, período de maior abundância de grãos de pólen. Ramos doadores e receptores foram selecionados entre aqueles que apresentavam inflorescências em mesma fase fenológica. Para colocar em contato os ramos doadores e receptores foi utilizada uma abertura de na extremidade do saco de papel, sendo que após o contato entre as inflorescências, o procedimento foi finalizado com o fechamento da sacola de papel e identificação do cruzamento, conforme as seguintes etapas descritas por Teixeira et al. (2011):

- **Proteção dos ramos receptores:** No dia 5 de Agosto de 2013, cinco dias após a indução do florescimento, os botões florais foram protegidos antes da antese utilizando sacos de papel para proteção dos ramos.
- **Escolha do ramo doador:** Vinte e quatro horas antes da antese os ramos doadores de pólen foram protegidos com saco de papel. Os ramos doadores escolhidos apresentavam inflorescências em mesma fase de desenvolvimento que apresentaram 90% a 100% das flores em antese no dia dos cruzamentos controlados.
- **Polinização:** No momento do cruzamento foi realizado o corte do ramo doador seguido da retirada das folhas do ramo. Através de uma abertura de aproximadamente 15 cm na extremidade o ramo doador foi colocado em contato com o receptor promovendo uma distribuição uniforme de pólen.
- **Fechamento do saco de papel protetor:** Após a polinização o procedimento foi finalizado com o fechamento cuidadoso da sacola de papel e identificação do cruzamento.

A compatibilidade entre os clones foi avaliada ao longo de seis meses a partir do desenvolvimento dos frutos (Figura 6 e 7). Visando certificar a identidade dos clones também foram instalados em campo seis diferentes unidades de recombinação compostas por dois clones com quatro repetições com distância superior a 700 m, totalizando oito plantas em cada ponto plantadas em espaçamento de 3 x 2 m.



Figura 6. Registro fotográfico da hibridação direcionada e desenvolvimento dos frutos em casa de vegetação: **A e B:** Ramos plagiotrópicos protegidos, **C:** Antese no dia da hibridação, **D, E e F:** Cruzamento compatível frutos em desenvolvimento (fase de chumbinho). Foto: Hilder Afonso



Figura 7. Desenvolvimento dos frutos da hibridação compatível realizada entre os clones 160 e 125 e de hibridação não compatível realizada entre os clones 160 e 130. A ocorrência de frutos nos cruzamentos não compatíveis deve-se a novos florescimentos ocorridos após a hibridação. Foto: Hilder Afonso

3.2 - AVALIAÇÃO *in vitro* DA COMPATIBILIDADE

Para caracterizar uma população de melhoramento segregante para o gene S foi utilizado método para visualização *in vitro* do desenvolvimento dos tubos polínicos. A avaliação do desenvolvimento do tubo polínico foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Rondônia no município de Porto Velho - RO. O diagnóstico da compatibilidade dos cruzamentos fundamenta-se na avaliação do desenvolvimento dos tubos polínicos diretamente no pistilo das plantas, 30 horas após a hibridação artificial. Tubos criogênicos de 10 ml com a solução de FAA (formaldeído a 10%, ácido acético glacial 10% e etanol 80%) foram utilizados na coleta de pistilos 30 horas após as hibridações direcionadas. 240 amostras foram avaliadas no Laboratório de Fitopatologia no dia seis de agosto de 2014, para visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos nos pistilos.

No preparo das amostras os pistilos foram imersos em NaOH 1N durante 24 horas, e corados durante duas horas com azul de anilina de 1% preparada em K_2PO_4 0,1 M. Os pistilos foram colocados em lâminas com o auxílio de água destilada, visualizados e analisados em microscópio do modelo Leica DM2500, equipado com sistema de fotodocumentação. A visualização dos pistilos foi realizada em microscópio de fluorescência com o uso do corante azul de anilina 1%, em aumento de 10 e 20 vezes, contabilizando o número de pistilos que apresentaram tubos polínicos completamente desenvolvidos (Figuras 4 e 5). Na avaliação da compatibilidade foram avaliadas duas lâminas por cruzamento com dez pistilos em cada lâmina, tendo sido considerados compatíveis os cruzamentos que apresentaram tubos polínicos completamente desenvolvidos no estilo ou na superfície do estigma.

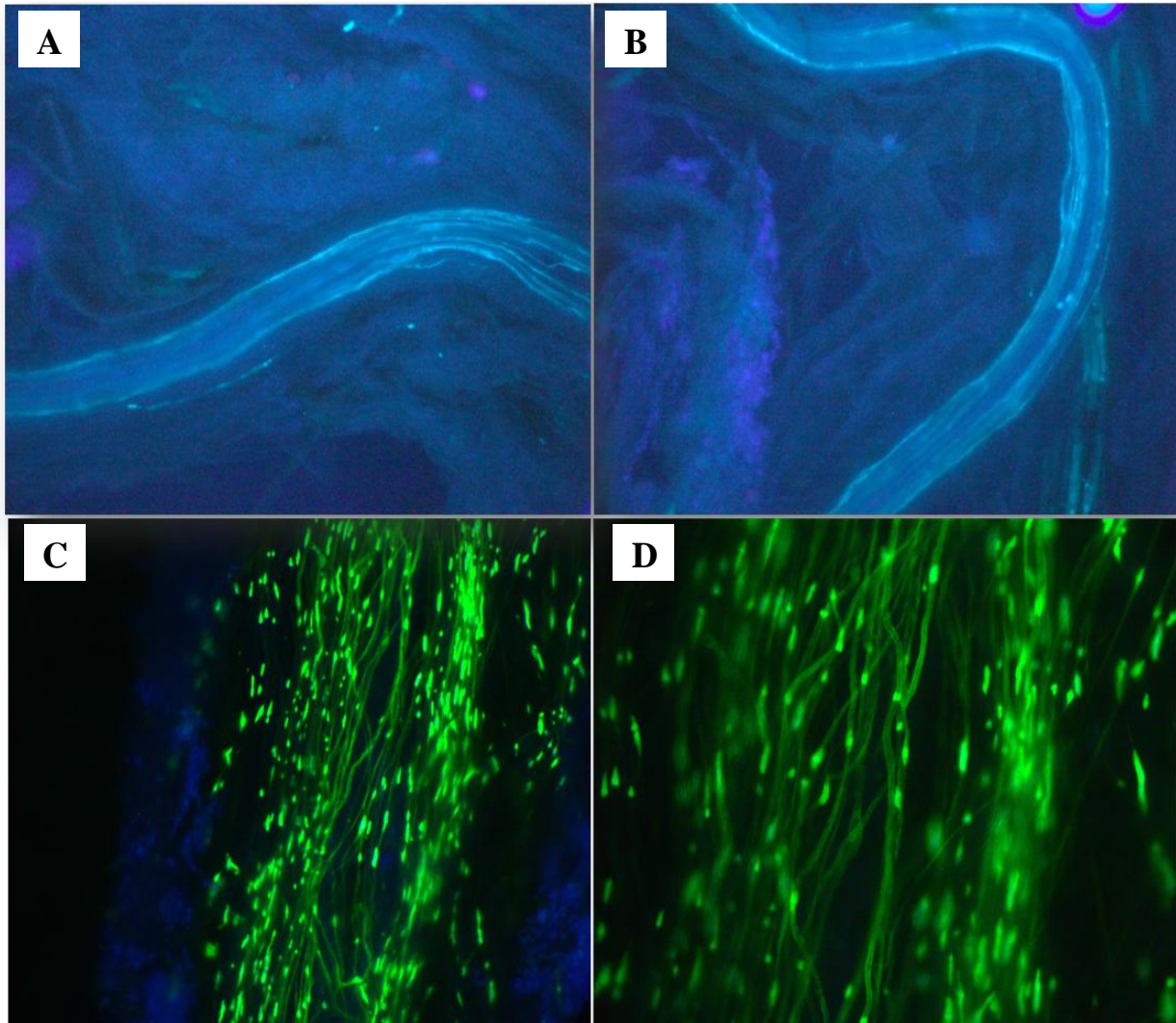


Figura 8. A e B: Estilos sem a presença de tubos polínicos desenvolvidos nos estigmas das flores receptoras avaliadas do cruzamento dos entre os clones 130 x 160. (cruzamentos não compatíveis). C e D: Estilos com a presença de tubos polínicos desenvolvidos nos estigmas das flores receptoras avaliadas do cruzamento entre os clones 125 x 199. (cruzamentos compatíveis). Foto: Tatiane Almeida Lopes

3.3 - INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

Um grupo de compatibilidade é formado por indivíduos que possuem o mesmo genótipo para o gene S, e por este motivo, não são compatíveis. O número de combinações (N), definido como o número de maneiras diferentes que os genótipos podem se organizar nos grupos de compatibilidade pode ser obtido pela expressão:

$$N = C^g \quad (i)$$

Em que: N = número possível de combinações entre g genótipos e C grupos de compatibilidade.

Tendo em vista que todos os procedimentos de hibridação têm uma probabilidade de erro e que uma genealogia pode ser obtida a partir de grande número de hibridações, utilizou-se um teste probabilístico para identificar a genealogia de maior probabilidade de ocorrência em função dos resultados obtidos.

Quando não existem informações sobre uma determinada população não há motivos para supor a existência de dois, três ou mais grupos de compatibilidade de modo que a hipótese H_0 a ser testada é de que todos os indivíduos de uma população fazem parte do mesmo grupo de compatibilidade.

Considerando uma taxa de erro de 5%, utilizou-se o teste da razão de verossimilhança para identificar a genealogia de máxima probabilidade de ocorrência. Para a utilização deste método é necessário o conhecimento da função de densidade de probabilidade da variável aleatória em estudo. Considera-se que a probabilidade de ocorrência das classes genotípicas nas populações segregantes avaliadas neste estudo assumem distribuição multinomial, função do número de formas alélicas do gene S, apresentada a seguir, segundo notação de (SCHUSTER e CRUZ, 2004):

$$L(p_i / n_i) = \lambda p_1^{n_1} p_2^{n_2} p_3^{n_3} \dots p_n^{n_n}; \quad \lambda = \frac{N!}{n_1! n_2! \dots n_n!}; \quad N = \sum_{i=1}^n n_i; \quad (ii)$$

Em que: N é o número de grupos de compatibilidade, n_i é o número de plantas de determinada classe genotípica que fazem parte do i -ésimo grupo de compatibilidade, com probabilidade p_i .

O teste da razão de verossimilhança consiste na comparação entre o estimador de máxima verossimilhança (θ_A) e de ocorrência da hipótese nula (θ_N), de que todos os indivíduos fazem parte de um mesmo grupo de compatibilidade:

$$Z = \text{Log}_{10} \left[L \frac{(\theta_A / x)}{(\theta_N / x)} \right] \quad (\text{iii})$$

Para verificar se a população encontra-se em Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) para o gene S, foi utilizado o teste de χ^2 para verificar a relação entre as frequências alélicas e as frequências genotípicas, estimadas pela expressão (CRUZ e REGAZZI, 2001).

$$P(S_1 S_2) = \frac{2pq}{1 - p^2 - q^2 - r^2} \quad (\text{iv})$$

$$P(S_1 S_3) = \frac{2pr}{1 - p^2 - q^2 - r^2} \quad (\text{v})$$

$$P(S_2 S_3) = \frac{2qr}{1 - p^2 - q^2 - r^2} \quad (\text{vi})$$

Em que, p: é a frequência da forma alélica S_1 , q: é a frequência da forma alélica S_2 e r: é a frequência da forma alélica S_3 .

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização da autoincompatibilidade atualmente é considerada um desafio na rotina dos programas de melhoramento de *Coffea canephora*. A avaliação de poucas dezenas de plantas resulta em um grande número de possibilidades o que dificulta a caracterização em larga escala da compatibilidade o que é devido à relação exponencial entre o número de genótipos e de grupos de compatibilidade (Figura 9).

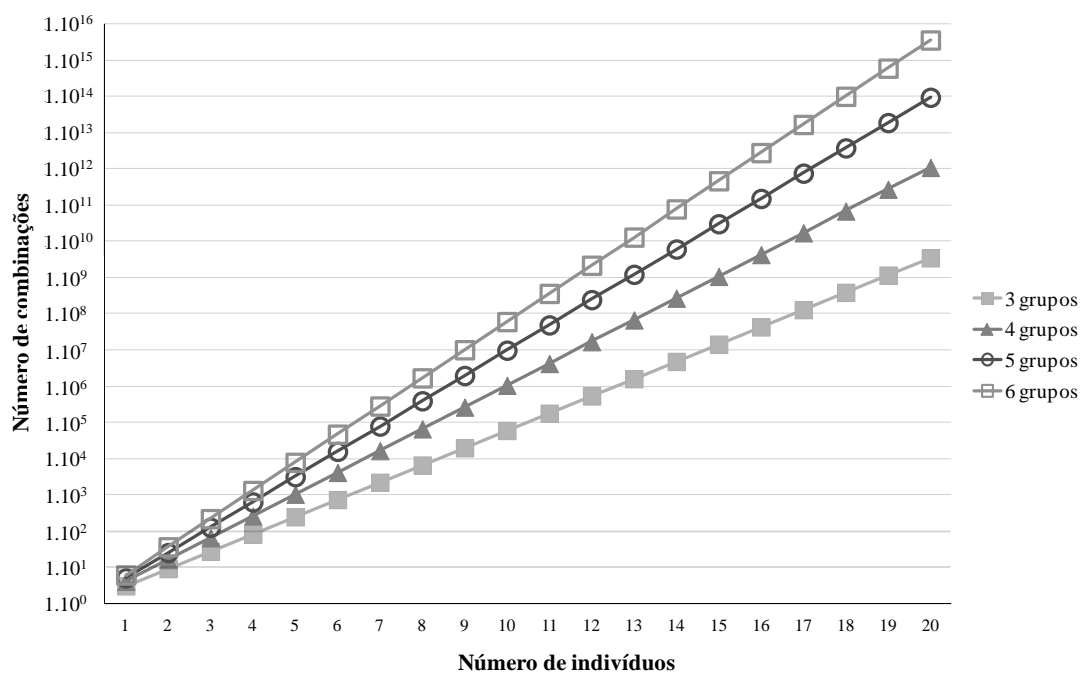


Figura 9. Número de maneiras possíveis com que n indivíduos ($1 \leq n \leq 20$) podem ser organizar em j grupos de compatibilidade ($3 \leq j \leq 6$).

A caracterização de plantas testadoras dos grupos de compatibilidade tem potencial para aumentar qualitativamente a eficiência das avaliações de campo, reduzindo o número de hibridações necessárias para caracterizar os genótipos do gene S. Segundo Borém e Miranda (2013), uma planta testadora é aquela que classifica corretamente os genótipos das plantas em avaliação.

Diferente do contexto normalmente empregado no melhoramento de plantas de utilização de plantas testadoras para determinação das capacidades específicas e gerais de combinação, a utilização de plantas testadoras para determinação dos grupos de

compatibilidade se fundamenta na avaliação da resposta de compatibilidade em comparação com uma planta de genótipo conhecido para o gene S. Nesse mesmo princípio plantas testadoras de *Coffea canephora* vêm sendo utilizadas para identificação de raças de ferrugem (*Hemileia vastatrix*), uma vez que a resposta de resistência também é governada por poucos genes de maior efeito (VÁRZEA et al., 2002).

A abertura não sincronizada das flores também é fator limitante para a realização de cruzamentos controlados em campo. Os resultados das hibridações direcionadas mostram que os genótipos avaliados se agruparam em três grupos de compatibilidade, identificados pelos algarismos romanos I, II e III (Figura 10).

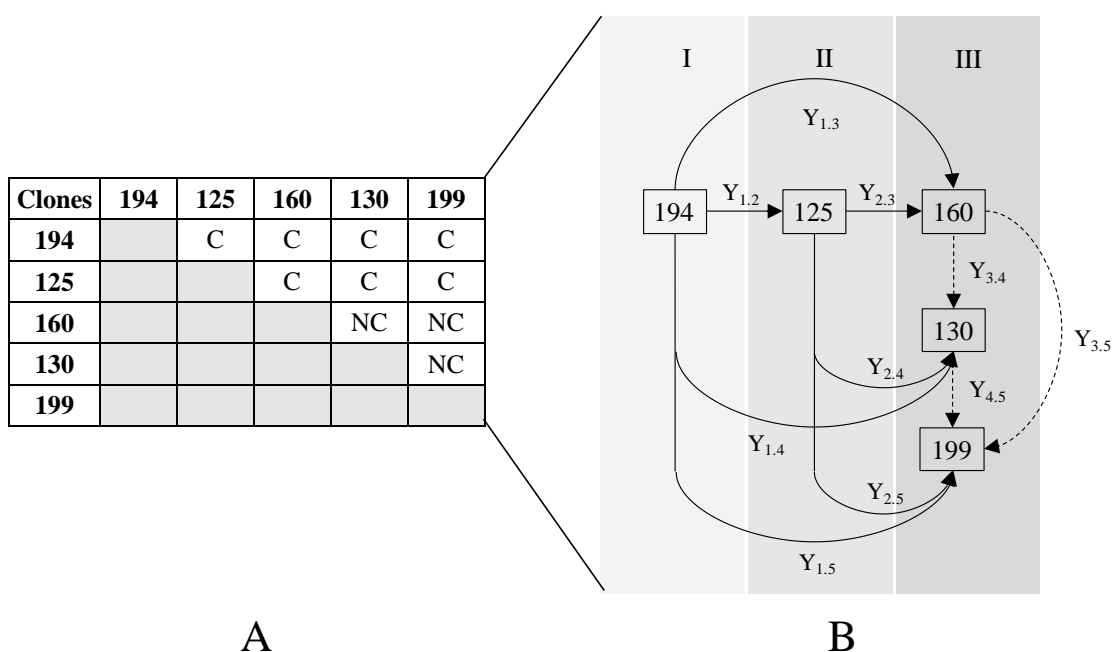


Figura 10. A. Resultados das hibridações direcionadas realizadas entre cinco clones de *Coffea canephora*, em que: C – cruzamento compatível, NC – cruzamento não compatível. **B.** Esquema mais provável de distribuição dos genótipos em seus respectivos grupos de compatibilidade indicados pelos algarismos romanos I, II e III.

O teste da razão de verossimilhança pondera a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade (H_0) e da hipótese alternativa (H_a) em função dos dados obtidos. Segundo Schuster e Cruz (2004), para serem interpretadas estimativas de LODscore devem ser iguais ou superiores a três que indicam que a hipótese H_0 é 1000 vezes mais provável que a hipótese

alternativa. A genealogia obtida está associada a um LODscore de 9, que indica que esse agrupamento é 10^9 vezes mais provável do que a hipótese H_0 de que todos os genótipos pertencem a um mesmo grupo de compatibilidade (Figura 10).

Para confirmar a identidade de plantas testadoras foram instalados seis campos de cruzamentos isolados, considerando uma distância mínima de 1000 metros de outras lavouras e proteção por vegetação natural de floresta. As unidades de recombinação confirmaram a compatibilidade dos cruzamentos 194 x 125, 194 x 160, 194 x 130, 194 x 199, 125 x 16, 125 x 130, 125 x 199 e a incompatibilidade dos cruzamentos 160 x 130, 160 x 199 e 199 x 130.

A realização das hibridações direcionadas em campo são demoradas, uma vez que os frutos devem ser desenvolver por até 6 meses e as hibridações devem ser realizadas em um curto período de tempo, no momento da floração.

Visando realizar avaliações em larga escala foram selecionados os clones 194, 125 e 160 para serem utilizados como plantas testadoras para visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos utilizando microscopia de fluorescência. Geralmente o *Coffea canephora* produz grãos de pólen binucleadas protegidos por duas camadas, uma camada interna de celulose chamada de intina e uma camada externa rugosa que favorece a fixação dos grãos de pólen, chamada de exina (CONAGIN e MENDES, 1961). Após a polinização os grãos de pólen que aderem ao estigma germinam formando um tubo polínico que cresce para dentro do estilete. O tubo polínico é um alongamento da célula do grão de pólen que cresce em direção ao ovário quimiotropicamente levando os núcleos vegetativo e germinativo. O azul de anilina apresenta alta afinidade pelas caloses, um polissacarídeo presente em menor concentração nas paredes celulares e em maior concentração nos andrósporos e ginósporos após a divisão meiótica, aumentando o contraste dos tubos polínicos (Figura 11). Ao alcançar o saco embrionário, o tubo polínico penetra e libera as células espermáticas no seu interior que fecundam o endosperma e o óvulo, dando origem ao endosperma e ao embrião respectivamente.



Figura 11. Detalhes das estruturas do tubo polínico no estigma da flor no aumento de 10 vezes (A) e de 20 vezes (B), destacando a ocorrência de caloses e sua disposição no estigma da planta. Foto: Tatiane Almeida Lopes

Os genótipos avaliados neste trabalho foram selecionados de uma população de melhoramento contendo 158 indivíduos provenientes de diferentes polos cafeicultores do Estado de Rondônia, que equivalem a uma intensidade de seleção de 9,8%. Embora estudos mais recentes de mapeamento genético e de genômica funcional não tenham apresentado evidências de ligação entre características produtivas e o gene S (LASHERMES et al., 1996; NOWAK et al., 2011), deve-se considerar que por obra do acaso e erros de amostragem, a seleção pode reduzir a variabilidade deste gene.

Segundo Vekeman e Slatkin (1994) o gene S apresenta genealogia semelhante à de genes neutros, que não têm sua frequência alterada pela seleção natural. Em uma população em Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), em que as frequências alélicas são idênticas ($p=q=r\dots z$), a probabilidade de um cruzamento ser compatível é de 0% quando estão presentes apenas duas formas alélicas, de 66,7% quando estão presentes três formas alélicas e de 83,3% quando estão presentes quatro formas alélicas diferentes (CHARLESWORTH e GUTTMAN, 1997). Isto indica que quanto maior a variabilidade para esse gene maior será a probabilidade de ocorrência de cruzamentos compatíveis.

A partir da visualização do desenvolvimento dos tubos polínicos foram avaliadas a compatibilidade de 73 genótipos, sendo que não foi possível avaliar a compatibilidade de sete amostras por dificuldades de visualização ou de preparação das lâminas. Desse universo, observou-se que 28 clones não foram compatíveis com o testador 194, 18 clones não foram compatíveis com o testador 125, 14 clones não foram compatíveis com o testador 160 e 13 clones foram compatíveis com todos os testadores indicando a existência de outras formas alélicas desse gene (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos acessos caracterizados de acordo em grupos de compatibilidade determinados pela visualização *in vitro* do desenvolvimento do tubo polínico. Os grupos de compatibilidade estão representados por algarismos romanos do I ao III.

| Grupos | Genótipo | N _o | f | N _e |
|--------------|-------------------------------|----------------|------|----------------|
| I | S ₁ S ₂ | 28 | 0,38 | 18,25 |
| II | S ₁ S ₃ | 18 | 0,25 | 18,25 |
| III | S ₂ S ₃ | 14 | 0,19 | 18,25 |
| ? | S _? S _? | 13 | 0,18 | 18,25 |
| Total | | 73 | 1 | 73 |
| χ^2 | | 7.71* | | |

χ^2 : Teste de chi-quadrado, N_o: número observado de plantas em cada um dos grupos de compatibilidade, f: frequência simples, N_e: Número esperado de plantas em cada um dos grupos de compatibilidade, ?: Outros grupos de compatibilidade, S_?: novas formas alélicas.

As frequências observadas diferem das proporções esperadas para uma população em EHW, de acordo com o teste de χ^2 com 5% de probabilidade. O mecanismo de determinação da compatibilidade coloca o gene S sobre seleção negativa dependente da frequência, o que significa que a frequência de um alelo é inversamente proporcional ao seu valor adaptativo (FALCONER, 1981). Ou seja, os indivíduos em uma população portadores de formas alélicas mais raras desse gene, se beneficiam da maior frequência de potenciais plantas doadoras de pólen, fazendo com que a taxa de fecundidade de um indivíduo seja inversamente proporcional à frequência do alelo na população. O distanciamento do equilíbrio indica que a população de segregante avaliada não apresenta a variabilidade genética do gene S no centro de origem dessa espécie.

Por se tratar de um mecanismo pré-zigótico que influencia na taxa de fecundidade dos grãos de pólen, a autoincompatibilidade contribui para que: nenhuma das formas alélicas do gene S possa se fixar na população, a taxa de mudança do gene S seja maior do que de um loco neutro e que os indivíduos sejam heterozigotos para esse gene. Em contraste com os resultados de Omolaja e Fawole, 2004, que observaram a ocorrência de cinco diferentes formas alélicas, avaliações em populações brasileiras tem indicado a existência de apenas três alelos (CONAGIN e MENDES, 1961; FERRÃO et al., 2007a). A possibilidade de identificar novos alelos do gene S em germoplasma brasileiro abre a possibilidade para um aumento significativo no número de grupos de compatibilidade, como mostrado na Tabela 6,

contribuindo para uma redução expressiva no percentual de grãos moca, pelo favorecimento natural de cruzamentos totalmente compatíveis.

Tabela 6. Número de grupos de compatibilidades que podem ser formados a partir de n formas alélicas do gene S.

| Nº de alelos | Formas alélicas | Nº de grupos |
|--------------|---|--------------------|
| 3 | S ₁ S ₂ S ₃ | 3 |
| 4 | S ₁ S ₂ S ₃ S ₄ | 6 |
| 5 | S ₁ S ₂ S ₃ S ₄ S ₅ | 10 |
| 6 | S ₁ S ₂ S ₃ S ₄ S ₅ S ₆ | 15 |
| ... | ... | ... |
| n | S _n S _(n-1) | $\frac{n(n-1)}{2}$ |

A caracterização do genótipo do gene S é importante, pois subsidia a seleção de clones superiores de diferentes grupos de compatibilidade. Ainda que poucos trabalhos tenham mensurado o efeito prejudicial da autoincompatibilidade em café Conilon (FERRÃO et al., 2007b), o plantio de genótipos não compatíveis pode aumentar a taxa de grãos tipo moca e diminuir a produtividade de grãos devido ao isolamento de plantas não compatíveis.

O *Coffea canephora* pode ser propagado por meio de sementes (propagação sexuada) ou por estaquia (propagação assexuada). Embora a propagação por estaquia permita reduzir a heterogeneidade da lavoura pelo plantio de clones com características semelhantes, deve-se considerar a redução de variabilidade que ocorre com o plantio de um número reduzido de genótipos. Para que ocorra a fertilização dos óvulos e desenvolvimentos dos frutos, uma lavoura de café deve ser constituída por clones compatíveis, sendo que lavouras formadas por apenas um, ou por poucos clones não compatíveis entre si não produzem frutos ou apresentam falhas na produção quando há um predomínio de plantas não compatíveis.

Geralmente, em *Coffea canephora* os testes realizados para identificação de clones compatíveis são realizados em campo, com a realização das hibridações direcionadas e

monitoramento do desenvolvimento dos frutos. De forma que é importante que uma variedade melhorada não seja descaracterizada pela retirada de clones no momento do plantio.

A caracterização de plantas testadoras associada à utilização de métodos de avaliação *in vitro* do desenvolvimento dos tubos polínicos podem ser utilizados em auxílio às avaliações de campo para caracterização da autoincompatibilidade do *Coffea canephora*, com potencial para subsidiar programas de melhoramento genético, visando melhorar a produtividade e a qualidade de grãos com o aumento da eficiência da polinização.

CONCLUSÕES

1. É possível induzir o florescimento sincronizado em casa de vegetação;
2. Foram identificadas três plantas testadoras dos grupos de compatibilidade de *Coffea canephora*;
3. O teste da razão de verossimilhança permitiu identificar a genealogia de maior probabilidade de ocorrência em função dos resultados das hibridações;
4. A avaliação *in vitro* do desenvolvimento dos tubos polínicos deve ser utilizada para complementar as avaliações de campo;
5. Foram encontradas plantas compatíveis com todos os testadores indicando a existência de pelo menos mais um grupo de compatibilidade.

REFERÊNCIAS

- ABIC. **Estatísticas**, 2015. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blüchner, 1971. 381 p.
- ANDERSON M. S; MUEHLBACHER, M; STREET I.P; PROFFITT, J.;POULTER, C. D. **Isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. An improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae***. J Biol Chem, 264(32):19169-75, 1989.
- BALDANI J. I; OLIVARES, F. L; HEMERLY, A. S; REISJR, F. B; OLIVEIRA, A. L. M; BALDANI, V. L. D;GOI, S. R; REIS, V. M; DOBEREINER, J. **Nitrogen-fixing endophytes: recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics**. In: "Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century -Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation". Elmerich, C., Kondorosi, A. and Newton, W.E. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Paris. pp. 203-206, 1998.
- BATEMAN, A.J. **Self-incompatibility systems in angiosperms**. I. Theory. Heredity, v.6, p.285-310, 1952.
- BERTHAUD, J. **Incompatibility in *Coffea-Canephora* - Test Method and Genetic Determinism**. Cafe Cacao The, v.24, n.4, p.267-274, 1980.
- BERTHAUD, J. **Propositions pour une nouvelle stratégie d'amélioration des caféiers de l'espèce *C. canephora*, basée sur les résultats de l'analyse des populations sylvestres**. In: . 11th International Scientific Colloquium on Coffee. ASIC: Paris. Anais. p.445-452, 1985.
- BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. **Genetic resources of *Coffea***. In: CLARKE, R. J. & MACRAE, R.(Ed.). Coffee: Agronomy. London: Elsevier, v. 4, p.1-42, 1988.
- BORÉM, A.; MIRANDA G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa, MG: 6^a Ed. UFV, p. 523, 2013.
- BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. **Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.36, p.765- 770, 2001.
- BREWBAKER J. L. **Pollen cytology and self-Incompatibility systems In plants**. J Hered 48:271-277, 1957.
- BRIDSON, D. M. **Additional notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa**. Kew Bulletin, Kew, v. 49, p. 331-342, 1994.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; REGAZZI, A. J.; SILVA, A. M.. **Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)**. Acta Horticulturae, n. 370, p. 45-57, 1995.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2.ed. Lavras: UFLA, p. 319, 2006.

BURTON, G.W. **Utilization of hybrid vigor**. In: WOOD, D.R. Crop breeding. Wisconsin : American Society of America, p.89-108,1983.

CARVALHO A.; COSTA, W. M.; FAZUOLI, L. C. **Autoincompatibilidade, produtividade, ocorrência de sementes do tipo moca e mudas anormais no café Icatu**. Bragantia, vol.42, n.1, Campinas, 1983. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87051983000100014>> Acesso em: 19 jul 2015.

CARAFIA, A. M.; CARRATU, G. **Stigma treatment with saline solutions: a new method to overcome self-incompatibility in *Brassica oleracea* L.** Journal of Horticultural Science, v.72, p.531-535, 1997. Disponível em:<http://www.jhortscib.org/Vol72/72_4/3.htm> Acesso em: 18 jul 2015.

CASTRIC, V.; VEKEMANS, X. **Invited Review: Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances**. Molecular Ecology, v.13, n.10, p.2873-2889, 2004.

CHARLESWORTH, D.; GUTTMAN, D. S. **Plant genetics: Seeing selection in S allele sequences**. Current Biology, v.7, n.1, p.R34-R37, 1997.

CHARLESWORTH, D.; AWADALLA, P. **Flowering plants self-incompatibility: the molecular population genetics of *Brassica* S-loci**. Heredity, v.81, p.1-9, 1998.

CHARRIER, A. **Etude de la pollinisation des caféiers cultivés sur la côte est malgache par marquage du pollen au phosphore et au soufre radioactifs**. Terre Malgache, v.12, p.229-249, 1972.

CHARRIER, A.; ESKES, A. B. **Botany and Genetics of Coffee**. In: WINTGENS, J. N.(Ed.). Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. Darmstadt: WILEY-VCH, p.25-56, 2004.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2015, Terceiro Levantamento**. Brasília, setembro de 2015. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_29_14_00_44_boletim_cafe_setembro_2015.pdf> Acesso em: 29 Set 2015.

CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A. J. T. **Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*; autoincompatibilidade em *Coffea canephora***. Bragantia, v.20, p.787-804, 1961.

CONTI, FÁTIMA. **Biometria - Qui quadrado**. Muitas Dicas. Laboratório de Informática - ICB - UFPA. Disponível em:< <http://www.ufpa.br/dicas/biome/biopdf/bioqui.pdf>> Acesso em:29 set 2015.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, p. 390, 2001.

CRUZ, C. DAMIÃO. **Princípios de Genética Quantitativa**. Viçosa: UFV. 22 ed., p.394, 2005.

DEVREUX, M.; VALLAYES, G.; POCHER, P.; EBERHART, S. A.; RUSSEL, W. A. **Stability parameters for comparing varieties**. Crop Science, v.6, p.36-40, 1959.

DE NETTANCOURT, D. **Incompatibility in angiosperms**. Sexual Plant Reproduction, v.10, p.185-199, 1997.

DE FRANCESCHI, P.; DONDINI, L.; SANZOL, J. **Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrinae* (*Rosaceae*)**. Journal of Experimental Botany, 2012.

DOUGHTY, J.; DIXON, S.; HISCOCK, S. J.; WILLIS, A. C.; PARKIN, I. A. P.; DICKINSON, H. G. **PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression**. The Plant Cell, v.10, p.1333-1347, 1998.

ESCH, H. E.; BURNS, J. E. **Distance estimation by foraging honeybees**. Journal of Experimental Biology, v.199, n.1, p.155-162, 1996.

ENTANI, T.; TAKAYAMA, S.; IWANO, M.; SHIBA, H.; CHE, F.; ISOGAI, A. **Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida*** Vilm. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.63, p.1882-1888, 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.63.1882>> Acesso em: 07 ago 2015.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa: UFV, p.279, 1981.

FAZUOLI, L. C. **Genética e melhoramento do cafeeiro**. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba : Potafos, p.87-106, 1986.

FAZUOLI, L. C.; SILVAROLLA, M. B.; CAMARGO, C. E. de O.; POMMER, C. V.; CHIAVEGATO, E. J.; DALL'ORTO, F. A. C.; NAGAI, H.; GODOY, I. J.; VEIGA, R. F. A. **Descritores mínimos para o registro institucional de cultivares: Café**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1994. (Documentos IAC, 46).

FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, M. A. G.; DE MUNER, L. H.; VERDIM FILHO, A. C.; VOLPI, P. S.; MARQUES, E. M. G.; ZUCATELI, F.. **Café Conilon: técnicas de produção com variedades melhoradas**. Circular Técnica, 03-I, Vitória, ES: Incaper, p.60, 2004.

FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; FONSECA, A. F. A.; FILHO, A. C. V.; VOLPI, P. S. **Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora***. In: FERRÃO, R. G. et al. Café conilon. Vitória, E.S.: Incaper, p.66-91, 2007a.

FERRÃO, R. G.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; PACOVA, B. E. V. **Melhoramento genético do *Coffea canephora***. In: FERRÃO, R.G. et al. (Ed.). Café Conilon. Espírito Santo: Incaper, p.121-173, 2007 b.

FRANCESCHI, P. DE; DONDINI, L.; SANZOL, J. **Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrinae* (*Rosaceae*)**. Journal of Experimental Botany 63: 4015-4032, 2012.

FRANKLIN-TONG, N.; FRANKLIN, F. C. H. **Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms**. Trends in Plant Science, v.8, n.12, p.598-605, 2003.

GAUDE, T.; DUMAS, C. **Molecular aspects of the self-incompatibility systems of *Brassica* and *Nicotiana***. Botanica Acta, v.103, p.323-326, 1990.

HASENSTEIN, K.H.; ZAWADA, M.S. **Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao***. Physiologia Plantarum, v.112, p.113-118, 2001.

HARING, V.; GRAY, J. E.; McCLURE, B. A.; ANDERSON, M. A.; CLARKE, A. E. **Self-incompatibility: a self-recognition system in plants**. Science, v.250, p.937-941, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/site/feature/data/plants2001/PDFs/250-4983-937.pdf>> Acesso em: 03 ago 2015.

HESLOP-HARRISON, J. **Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: the organization of the stigma in *Tritifium pratense* L.** Annals of Botany 51: 571-583, 1983.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Ed. Guanabara Koogan, 10 ed. p.488, 2004.

KRUG, C. A. **Controle da polinização do cafeeiro**. v. 15, Campinas: IAC, p.12, 1938. (Boletim Técnico)

LASHERMES, P.; COUTURON, E.; MOREAU, N.; PAILLARD, M.; LOUARN, J. **Inheritance and genetic mapping of self-incompatibility in *Coffea canephora* Pierre**. Theoretical and Applied Genetics, v.93, n.3, p.458-462, 1996.

LAWRENCE, M.J. **Number of incompatibility alleles in clover and other species** *Heredity*. v.76, p.610-615, 1996.

LEE, S.H.; HONG, M. Y.; KIM, S.; LEE, J. S.; KIM, B. D.; MIN, B. H.; BAEK, N. K.; CHUNG, Y. Y. **Controlling self-incompatibility by CO₂ gas treatment in *Brassica campestris*: structural alteration of papillae cell and differential gene expression by increased CO₂ gas**. Molecules and cells, v.11, p 186-191, 2001.

LUNDQVIST, A. **Disomic control of self-incompatibility in the tetraploid *Ranunculus repens* (*Ranunculaceae*)**. Hereditas, v.128, p.181-183, 1998.

MARCOLAN, A. L.; RAMALHO, A. R.; MENDES, A. M.; TEIXEIRA, C. A. D.; FERNANDES, C. F.; COSTA, J. N. M.; JÚNIOR, J. R. V.; OLIVEIRA, S. J. M.; FERNANDES, S. R.; VENEZIANO, W. **Cultivo dos cafeeiros conilon e Robusta para Rondônia**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, p.61, 2009. Disponível em:< http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/sp33_cafe.pdf> Acesso em: 23 fev 2015.

MAUCH-MANI B.; MAUCH F. **The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions**. Curr Opin Plant Biol. 8(4):409-14, 2005.

McCUBBIN, A., G., KAO, T. **The emerging complexity of self-incompatibility (S-) loci.** Sexual Plant Reproduction, v.12, p.1-5, 1999.

MENDES, C. H. T. **Introdução ao estudo da auto-esterilidade no gênero *Coffea*.** Bragantia, 9:25-41, 1949.

MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. **Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy.** Soil Science, vol.167, p. 739-749, 2002.

MICHAELSON-YEATES, T.P.T.; MARSHALL A.; ABBERTON, M. T.; RHODES, I. **Self-compatibility and heterosis in white clover (*Trifolium repens* L).** Euphytica, v.94, p.341-34, 1997.

MONTAGNON, C.; LEROY, T.; YAPO, A. **Genotypic and phenotypic diversity of some coffee groups (*Coffea canephora* Pierre) in the collections - consequences on their use in breeding.** Café Cacao Thé, v.36, n.3, p.187 - 198, 1992.

NOWAK, M. D.; DAVIS, A. P.; ANTHONY, F.; YODER, A. D. **Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility RNases in *Coffea* (Rubiaceae).** Plos One, v.6, n.6, 2011.

OMOLAJA, S. S.; FAWOLE, I. **Determination of the number of self-incompatibility alleles (SIA) in *Coffea canephora* and the role of pollen-stylar protein in the expression of SIA.** 20th International Conference on Coffee Science. Bangalore, India Anais, 11-15, p.684-687, 2004.

PORTO, S. I.; OLIVEIRA NETO, A. A.; SOUSA, F. O. B. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Café - Safra 2013.** v. 1, Brasília: Conab, p. 22, 2013.

POEHLMAN, J.M.; SLEPER, D. **Breeding field crops.** Ames: Iowa State University, 494 p.,1995.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Alelismo múltiplo. Genética na Agropecuária.** 4. ed. Lavras: UFLA, p.169-190, 2008.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. **Genética na agropecuária.** São Paulo: Globo, p. 359, 1990.

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems.** London : Chapman & Hall, p.529, 1997.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. **Melhoramento de café arábica.** In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p. 189-204, 1999.

SASSA, H.; KAKUI, H.; MINAMIKAWA, M. **Pollen-expressed F-box gene family and mechanism of S-RNase-based gametophytic self-incompatibility (GSI) in Rosaceae.** Sexual Plant Reproduction 23: 39-43, 2010. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20165962>> Acesso em: 14 Jul. 2015.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. **Autoincompatibilidade em plantas.** Ciencia Rural, v.32, p.1083-1090, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n6/12759.pdf>> Acesso em: 23 fev 2015.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados.**, Viçosa- MG: Editora UFV, p. 568, 2004.

TEIXEIRA, A. L.; ROCHA, R. B.; RAMALHO, A. R. **Melhoramento genético, registro e proteção de cultivares de *Coffea canephora* para o Estado de Rondônia.** Porto Velho: Embrapa Rondônia, p. 23, 201.(Documentos 143)

TEZUKA T.; TSURUHARA A.; SUZUKI H.; TAKAHASHI, S. Y. **A connection between the self-incompatibility mechanism and the stress response in lily.** Plant and Cell Physiology, v.38, p.107-112, 1997. Disponível em:<<http://pcp.oxfordjournals.org/content/38/2/107.full.pdf+html>> Acesso em: 15 Jul. 2015.

VÁRZEA, V. M. P.; RODRIGUES JÚNIOR, C. J.; SILVA, M. C.; GOUVEIA, M.; MARQUES, D. V.; GUERRA GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A. Resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. In: ZAMBOLIM, L.(Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café.** Viçosa, MG: UFV/FIP, 2002. p.297-320.

VEKEMAN, X.; SLATKIN, M. **Gene and allelic genealogies at a gametophytic self-incompatibility locus.** Genetics and Molecular Biology, v.137, p.1157-1165, 1994.

WESTWOOD, J.H.; TOMINAGA, T.; WELLER, S. C. **Characterization and breakdown of self-incompatibility in field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.).** The Journal of Heredity, v.88, p.459-465, 1997. Disponível em:<<http://jhered.oxfordjournals.org/content/88/6/459.full.pdf>> Acesso em: 18 Jul. 2015.

WHITEHOUSE, H.L.K. **Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of the angiosperms.** Annals of Botany New Series, v.14, p.199-216, 1951. Disponível em:<<http://aob.oxfordjournals.org/content/14/2/199.full.pdf+html>> Acesso em: 18 Jul. 2015.

WHEELER M. J.; ALLAN A. C.; JORDAN N. D.; RUDD J. J.; FRANKLIN-TONG V. E.; FRANKLIN, F. C. H. **The intracellular events triggered by the self-incompatibility response in *Papaver rhoeas*.** Protoplasma, v.208, p. 99-106, 1999.